

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-199898

(43)公開日 平成5年(1993)8月10日

(51)Int.Cl.⁵

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 M 1/00

識別記号

庁内整理番号

A 8114-4B

A 9050-4B

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数8(全 23 頁)

(21)出願番号 特願平3-241315

(22)出願日 平成3年(1991)9月20日

(31)優先権主張番号 特願平2-259011

(32)優先日 平2(1990)9月28日

(33)優先権主張国 日本 (J P)

(31)優先権主張番号 特願平3-90879

(32)優先日 平3(1991)4月22日

(33)優先権主張国 日本 (J P)

(31)優先権主張番号 特願平3-191868

(32)優先日 平3(1991)7月31日

(33)優先権主張国 日本 (J P)

(71)出願人 000003078

株式会社東芝

神奈川県川崎市幸区堀川町72番地

(72)発明者 橋本 幸二

神奈川県川崎市幸区小向東芝町1番地 株
式会社東芝総合研究所内

(72)発明者 三輪 桂子

神奈川県川崎市幸区小向東芝町1番地 株
式会社東芝総合研究所内

(72)発明者 石森 義雄

神奈川県川崎市幸区小向東芝町1番地 株
式会社東芝総合研究所内

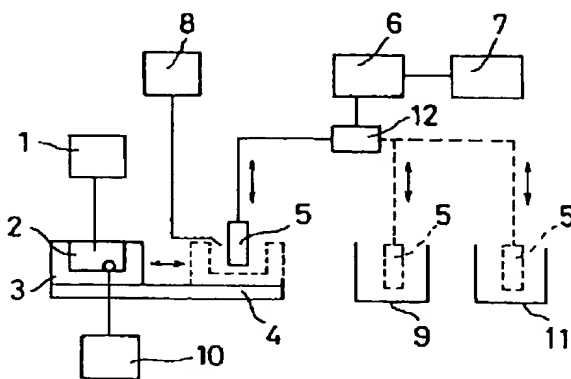
(74)代理人 弁理士 鈴江 武彦

(54)【発明の名称】 遺伝子検出法

(57)【要約】

【構成】検出すべき目的遺伝子に対して相補的な塩基配列を有する一本鎖の核酸プローブと、一本鎖に変性された遺伝子サンプルとを反応させた後、遺伝子とハイブリダイズした核酸プローブを検出することによって目的遺伝子の存在を確認する遺伝子検出法において、核酸プローブを電極表面に固定化し、二本鎖核酸に特異的に結合しかつ電気化学的に活性な二本鎖認識体を核酸プローブと遺伝子サンプルとの反応系に添加し、および電極を介した電気化学的な測定により核酸プローブと目的遺伝子との二本鎖核酸に結合した二本鎖認識体を検出し、これにより目的遺伝子とハイブリダイズした前記核酸プローブの存在を検出することを特徴とする。

【効果】放射性同位体を用いることがないので安全性および簡便性に優れ、さらに短時間で目的とする遺伝子の有無を高感度に検出することができる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 検出すべき目的遺伝子に対して相補的な塩基配列を有する一本鎖の核酸プローブと、一本鎖に変性された遺伝子サンプルとを反応させた後、遺伝子とハイブリダイズした前記核酸プローブを検出することによって前記目的遺伝子の存在を確認する遺伝子検出法において、

前記核酸プローブを電極表面に固定化して用いることと、

二本鎖核酸に特異的に結合し、かつ電気化学的に活性な二本鎖認識体を、前記核酸プローブと遺伝子サンプルとの反応系に添加することと、

前記電極を介した電気化学的な測定により、前記核酸プローブと目的遺伝子との二本鎖核酸に結合した二本鎖認識体を検出し、これにより目的遺伝子とハイブリダイズした前記核酸プローブの存在を検出することを特徴とする遺伝子検出法。

【請求項2】 電極表面に固定化された核酸プローブと、一本鎖に変性された遺伝子サンプルとのハイブリダイゼーションの際に、電極に電位を印加する請求項1記載の遺伝子検出法。

【請求項3】 検出すべき目的遺伝子に対して相補的な塩基配列を有する一本鎖の核酸プローブと、一本鎖に変性された遺伝子サンプルとを反応させた後、遺伝子とハイブリダイズした前記核酸プローブを検出することによって前記目的遺伝子の存在を確認する遺伝子検出法において、

前記核酸プローブを光ファイバーに固定化して用いることと、

二本鎖核酸に特異的に結合し、かつ光化学的に活性な二本鎖認識体を、前記核酸プローブと遺伝子サンプルとの反応系に添加することと、

前記光ファイバーを介した光化学的な測定により、前記核酸プローブと目的遺伝子との二本鎖核酸に結合した二本鎖認識体を検出し、これにより目的遺伝子とハイブリダイズした前記核酸プローブの存在を検出することを特徴とする遺伝子検出法。

【請求項4】 前記二本鎖認識体が挿入剤である請求項1または3記載の遺伝子検出法。

【請求項5】 前記挿入剤が、電気的に可逆な酸化還元反応を起こす金属を中心金属とする金属錯体であって、該金属の酸化還元電位が核酸の酸化還元電位未満であるか、もしくは核酸の酸化還元電位に重なることのない金属錯体である請求項4記載の遺伝子検出方法。

【請求項6】 前記二本鎖認識体が、二本鎖核酸に特異的に結合する生体高分子である請求項1または3記載の遺伝子検出法。

【請求項7】 特定の塩基配列を有する遺伝子を検出するための自動遺伝子検出装置であって、

電極もしくは光ファイバーの表面上に核酸プローブを固

定化した遺伝子検出センサと、

遺伝子検出センサを移動させるための移動手段と、

一本鎖に変性された遺伝子サンプルを含有する試料溶液を貯留し、遺伝子サンプルと遺伝子センサの表面に固定化された核酸プローブとのハイブリダイゼーションにより遺伝子センサ上に二本鎖核酸を形成するための反応槽と、

試料溶液の温度を制御する温度制御手段と、

遺伝子サンプルとのハイブリダイゼーションの後、遺伝子センサを洗浄して未反応の遺伝子サンプルを除去するための洗浄手段と、

二本鎖認識体を含有する溶液を貯留し、二本鎖認識体と遺伝子センサ表面上に形成された二本鎖核酸とを反応させることにより二本鎖認識体を二本鎖核酸に結合させ、結合した二本鎖認識体が生ずる電気化学的もしくは光学的な信号を検出するための検出槽と、を具備する自動遺伝子検出装置。

【請求項8】 遺伝子センサ表面上に形成された二本鎖核酸を、遺伝子センサ表面上に固定化された核酸プローブと一本鎖遺伝子サンプルとに解離し、遺伝子サンプルを除去して遺伝子センサを再生するための解離手段をさらに具備する請求項7記載の自動遺伝子検出装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、試料中に存在する特定の遺伝子の特異的に検出するための遺伝子検出法および遺伝子検出装置に関する。

【0002】

【従来の技術】遺伝子(DNA)に刻み込まれた遺伝情報は、メッセンジャーRNAを介して蛋白質あるいは酵素として表現される。この蛋白質や酵素の働きにより、生命の維持に必要な様々な化合物の生合成および代謝が行なわれる。このように、遺伝子に支配された多様な物質の動的平衡系として、生物が存在しているわけである。

【0003】ヒトの遺伝子の総数は5~10万といわれている。これら遺伝子の中に、例えば欠損や重複のような何等かの異常や変化が生じると、生成される蛋白質の特性、種類および量などが変化し、結果として生体系のバランスが崩れて疾病を引き起こすことになる。従って、逆に病因となる既知の遺伝子を検出することによって、疾患の同定や予防が可能である。このような遺伝子そのものに基づく診断は、近年の遺伝子工学の進歩によって可能となったもので、遺伝子診断と呼ばれている。従来の診断法と比較して、遺伝子診断には次のような幾つかの特色がある。

【0004】遺伝子発現の機構を考えると、殆どの生化学レベルでの変化に先行して、遺伝子上での変化が生じていることが推定される。従って、遺伝子変化の検出による遺伝子診断では、病気という表現型での変化に先だ

って、即ち、発症前や病気の潜伏期あるいは極めて初期の段階で、診断や予測ができる。これが第一の特色である。第二の特色は、生体内の細胞では遺伝子は全て同一であるので、遺伝性の疾患に関する遺伝子診断法は、分析する臓器や組織に依存しないことである。このことは、特に胎児での診断では重要である。即ち、この特色によって、妊婦から羊水を採取し、羊水中に浮遊している胎児の細胞を調べるだけで診断を行なうことが可能となる。一般的な遺伝子診断法において、従来用いられている遺伝子検出法の手順を略記すれば次の通りである。

【0005】まず、試料から遺伝子を抽出し、必要があれば適当な制限酵素で切断した後、電気泳動およびサザンブロットを行なう。次に、目的とする遺伝子に対して相補的な塩基配列を有する核酸プローブ（通常は、放射性同位元素でラベルされている）を、ブロットされた遺伝子とハイブリダイスさせる。続いて、低温でX線フィルムに感光させることによりハイブリダイスされた核酸プローブを検出し、目的とする遺伝子の存在を確認する。

【0006】上記従来の検出法は、放射性同位元素を使用するため診断場所が限定され、試薬の取扱いにも十分注意しなければならない。この点を改善するために、放射性同位元素に代わる安全なラベル剤の開発が進められており、例えばアビジン-ビオチン結合を利用する方法、酵素や蛍光物質を使用する方法等、幾つかのプローブ検出方法が既に提案されている。しかし、これらは感度の点で放射性同位元素を凌駕するまでには至っていない。また、何れの方法も遺伝子検出までに少なくとも2〜3日間を要し、測定操作もかなり複雑かつ複雑であるという問題がある。一方、試料中に存在する特定の抗原または抗体の定量分析には、一般にラジオイムノアッセイ（以下、RIAと略記する）が用いられている。しかしながら、RIAでは前記の遺伝子診断方法と同様に放射性同位体を用いるため、専用の機器を設置し、その操作も資格を有するオペレータが行なわなければならない。これに加えて廃棄物の処理等にも注意を必要とする。また、その他の分析方法として、例えば免疫電気泳動法が知られているが、この方法は測定に長時間を要するうえ感度が低く、被検物質がごく微量にしか含まれていない場合には適用することができない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は上記事情に鑑みてなされたもので、その課題は、安全性および簡便性に優れると共に、短時間で目的とする遺伝子の有無を高感度に検出することができる遺伝子検出法を提供することにある。

【0008】また、本発明は、安全性および簡便性に優れると共に、短時間で目的とする遺伝子の有無を高感度に検出することができる遺伝子検出装置を提供することをも課題とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明による遺伝子検出法は、検出すべき目的遺伝子に対して相補的な塩基配列を有する一本鎖の核酸プローブと、一本鎖に変性された遺伝子サンプルとを反応させた後、遺伝子とハイブリダイスされた前記核酸プローブを検出することによって前記目的遺伝子の存在を確認する遺伝子検出法において、前記核酸プローブを電極表面、または光ファイバー先端に固定化して用いることと、二本鎖核酸に特異的に結合し、且つ電気化学的または光化学的に活性な二本鎖認識体を、前記核酸プローブと遺伝子サンプルとの反応系に添加することと、

【0010】前記電極または前記光ファイバーを介した電気化学的または光化学的な測定により、前記核酸プローブと目的遺伝子との二本鎖核酸に結合した二本鎖認識体を検出することにより、目的遺伝子とハイブリダイスされた前記核酸プローブの存在を検出することの特徴とするものである。以下に本発明の詳細を説明する。

【0011】本発明において「二本鎖認識体」とは、二本鎖の核酸を認識し、特異的に結合する物質を指す。そのような物質としては、例えば、挿入剤、二本鎖核酸を認識する生体高分子を挙げることができる。

【0012】挿入剤(intercalating agents)と呼ばれる物質は、二本鎖DNA等の二本鎖核酸に特異的に結合(intercalation)する特徴がある。これら挿入剤はどれも分子中にフェニル基等の平板状挿入基を有し、該挿入基が二本鎖核酸の塩基対と塩基対の間に介入することによって、二本鎖核酸と結合する。挿入剤の多くは光学活性物質であり、核酸の定性に用いられているものもある。また、挿入剤の中には電極応答する物質もある。従って、光学的变化または電気化学的变化の測定によって、二本鎖核酸に結合した挿入剤を検出することができる。

【0013】本発明で用いる電気化学的、光化学的に活性な挿入剤は特に限定されるものではなく、例えばエチジウム、エチジウムブロマイド、アクリジン、アミノアクリジン、アクリジンオレンジ、プロフラビン、エリブチシン、アクチノマイシンD、ドーノマイシン、マイトマイシンC等を用いることができる。また、その他の使用可能な挿入剤としては、特開昭62-282599号公報に記載されたものが挙げられる。

【0014】また、電極を用いて電気化学的变化を検出する場合には、挿入剤として、上述の挿入剤自身が酸化還元反応に対して可逆的である物質の他に、電気的に可逆な酸化還元反応を起こす物質を中心金属として含有する金属錯体、すなわちメタロインターカレーターを用いることができる。このようなメタロインターカレーターとしては、例えばトリス（フェナントロリン）亜鉛錯体、トリス（フェナントロリン）ルテニウム錯体、トリス（フェナントロリン）コバルト錯体、ジ（フェナントロリン）亜鉛錯体、ジ（フェナントロリン）ルテニ

ウム錯体、ジ(フェナントロリン)コバルト錯体、ビビリジンプラチナ錯体、タービリジンプラチナ錯体、フェナントロリンプラチナ錯体、トリス(ビビリジル)亜鉛錯体、トリス(ビビリジル)ルテニウム錯体、トリス(ビビリジル)コバルト錯体、ジ(ビビリジル)亜鉛錯体、ジ(ビビリジル)ルテニウム錯体、ジ(ビビリジル)コバルト錯体を挙げることができる。挿入剤はこれらに限定されるものではないが、錯体の中心金属もしくは挿入剤自身の酸化還元電位が核酸の酸化還元電位以上であったり、核酸の酸化還元電位に重なることのないものが望ましい。

【0015】このような電気化学的に可逆である酸化還元反応を起こす挿入剤を用いることにより、酸化還元電流を繰り返して測定することが可能となる。したがって、電位走査を数回ないし数百回繰り返し、得られた信号の値を積算することにより信号の増幅を行なうことができ、その結果、より高感度の検出が可能となる。

【0016】さらに、電極を用いて遺伝子の検出を行なう場合には、電気化学発光を生じる挿入剤を利用することもできる。このような挿入剤は特に限定されるものではなく、例えば、ルミノール、ルシゲニン、ヒレン、ジフェニルアントラセンおよびルブレンを挙げることができる。これらの挿入剤による電気化学発光は、ホタルルシフェリン、デヒドロルシフェリンのようなルシフェリン誘導体、フェニルフェノール、クロロフェノールのようなフェノール類もしくはナフトール類のようなエンハンサーを用いることにより増強することが可能である。

【0017】電気化学発光によって生じた光学的な信号は、例えば、フォトンカウンタを用いて溶液から直接検出すればよい。また、電極の代わりに、光ファイバーの先端に透明電極を形成することにより作成した光ファイバー電極を用いて間接的に検出することもできる。

【0018】電極反応または光学的な信号の変化は担体表面でしか起こらないことから、未反応のプロープや未反応の挿入剤を除去することなく非常に簡単に検出を行なうこともできる。

【0019】なお、本発明において、核酸プロープと一本鎖遺伝子サンプルとの反応は、一般的に溶液中で行なわれる。その際、上記の挿入剤の存在下で核酸プロープと遺伝子サンプルとの反応を行なってもよく、また該反応の終了後に挿入剤を添加しても良い。

【0020】上述のように、多くの挿入剤はそれ自体で光学活性を有するか、または電極応答が可能な物質であり、光学的または電気化学的な測定により直接測定を行なうことができる。このような挿入剤に、さらに直接もしくは間接的に信号を検出することが可能な物質を結合させ、挿入剤自信の信号と併せて測定することにより検出の感度を高めることが可能である。

【0021】このような直接もしくは間接的に信号を検出することが可能な物質としては、例えば、ヒオチン、

トリニトロベンゼンスルホン酸、ジニトロベンゼンスルホン酸等のハプテン、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、フィコシアニン、ローダミン等の蛍光物質、ルミノール、ルシゲニン、アクリジニウムエステル誘導体等の発光物質、フェロセン、ピオローゲン等の電極活性物質を挙げることができる。上記ハプテンのように直接信号を検出することができない物質を用いる場合には、酵素結合アビジンのような酵素結合抗ハプテン抗体を利用して酵素反応による物質の吸光、蛍光、発光、消光、円偏光二色性、蛍光偏光のような光学的情報を測定するか、もしくは電極活性を測定することにより間接的に遺伝子の検出を行なう。

【0022】これらの物質は、通常、挿入剤1分子当たり1分子結合させるが、同種の物質を挿入剤1分子当たり複数分子結合させることにより、さらに感度を高めることができる。

【0023】これとは別に、生体高分子の中には二本鎖核酸を認識して特異的に結合する物質が存在する。したがって、このような生体高分子もしくはこの生体高分子を認識する物質に、酵素、蛍光物質、発光物質のような標識物質を結合し、この標識物質に起因する電気化学的もしくは光学的な変化を測定して生体高分子の存在の有無を確認することにより二本鎖核酸を検出することが可能となる。

【0024】このような生体高分子としては、抗DNA抗体、クロ(Cro)タンパク質、cIリプレッサー、大腸菌のCRP(cAMP受容タンパク質)、ラクトースオペロンリプレッサーのようなDNA結合タンパク質、触媒活性が失活したRNaseHのような酵素を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。また、上記生体高分子は、生体由来であっても、合成により得られるものであっても良い。

【0025】上記生体高分子に結合させる標識剤としての酵素は特に限定されるものではなく、例えばアルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼを挙げることができる。

【0026】上記生体高分子を用いて電気化学的な変化を検出する場合には、例えば、 NAD^+/NADH サイクルにおけるNADH、カテコール/キノンサイクルにおけるキノンを利用することができる。すなわち、生体高分子に結合した酵素により生成したNADHもしくはキノンを電極自体で酸化もしくは還元し、その電気的な変化を測定すれば良い。なお、このような電気化学的な酸化還元反応に関わる物質は、これらに限定されるものではない。

【0027】上記生体高分子を用いて光学的変化を検出する場合には、生体高分子に酵素を結合し、化学発光基質を用いて酵素反応を行なうか、もしくは生体高分子に蛍光物質を結合してその蛍光を直接検出する。本発明で用いることができる化学発光基質は特に限定されるものではなく、使用可能な化学発光基質としては、ルミノール

10

20

30

40

50

ル、イソルミノール、イソルミノール誘導体、アクリジニウム誘導体を挙げることができる。化学発光基質を使用する場合には、エンハンサーを用いて化学発光を増強させることもできる。このエンハンサーとしては、特に限定されるものではないが、例えばホタルルシフェリン、デヒドロルシフェリンのようなルシフェリン誘導体、フェニルフェノール、クロロフェノールのようなフェノール類もしくはナフトール類を挙げることができる。さらに、本発明で用いることができる蛍光物質は特に限定されるものではなく、使用可能な蛍光物質としては、フルオレセイン、ローダミン、フィコシアニンを挙げることができる。

【0028】二本鎖認識体の添加量は特に限定されるものではないが、効率の点からは形成された全ての二本鎖に結合するに十分な量であることが好ましい。過剰に添加して未反応のまま残存する二本鎖認識体は、測定の前に洗浄除去する。

【0029】二本鎖認識体の添加量が少なく低濃度である場合には、二本鎖認識体が形成された二本鎖核酸と結合した後は、系内に残存する未反応の二本鎖認識体の量は極少量となる。すなわち、相対的に、二本鎖認識体は担体上に濃縮された状態となる。このような状態においては、核酸プローブと未反応の試料DNA、および形成された二本鎖に結合していない遊離の二本鎖認識体とを洗浄除去することなく遺伝子の検出を行なうことができ、ハイブリダイゼーションから目的遺伝子の検出まで全ての反応を同一系内で連続的に行なうことが可能となる。

【0030】本発明においては、使用する核酸プローブを変えることにより種々の遺伝子の検出を行なうことができる。使用することができる核酸プローブの例としては、食品に含まれる微生物、植物ウイルスもしくはウイルス、人体に感染し、感染症等を引き起こす病原性微生物もしくはウイルス、遺伝病の原因遺伝子、活性化プロトオンコジーン、またはミニサテライト塩基配列のそれぞれの全体もしくはその一部の塩基配列に相補的な配列を有するプローブを挙げることができる。

【0031】核酸プローブとして、食品に含まれる微生物の全体もしくはその一部の塩基配列に相補的な配列を有するプローブを用いた場合には、食品に含まれる微生物の直接検出を行なうことができ、食品衛生検査が可能になる。このような食品に含まれる微生物としては、例えば、病原性の大腸菌、ブドウ球菌、サルモネラ菌を挙げることができる。

【0032】核酸プローブとして、植物ウイルスもしくはウイルスの一部の塩基配列に相補的な配列を有するプローブを用いた場合には、植物に感染した植物ウイルスもしくはウイルスの検出を行なうことができ、農業分野における感染症診断が可能になる。このような植物

ウイルスもしくはウイルスとしては、例えば、タバコモザイクウイルス、カリフラワーモザイクウイルスを挙げることができる。

【0033】核酸プローブとして魚類に感染する病原性微生物もしくはウイルスの全体あるいはその一部の塩基配列に相補的な配列を有するプローブを用いた場合には、魚類に感染する病原性微生物もしくはウイルスの検出を行なうことができ、水産分野における感染症診断が可能になる。このような魚類に感染する病原性微生物としては、例えば、病原性ビブリオを挙げることができる。

【0034】核酸プローブとして人体に感染し、感染症等を引き起こす病原性微生物もしくはウイルスの全体あるいはその一部の塩基配列に相補的な配列を有するプローブを用いた場合には、感染症診断が可能になる。このような人体に感染して感染症等を引き起こす病原性微生物としては、例えば、病原性微生物であるストレプトコッカス、マイコプラズマ、クロストリジウム、クラミジア、サルモネラ、単純ヘルペス、サイトメガロウイルスを挙げることができる。

【0035】核酸プローブとして遺伝病の原因遺伝子の全体もしくはその一部の塩基配列に相補的な配列を有するプローブを用いた場合には、遺伝病の直接検定が可能になる。このような遺伝病の原因遺伝子としては、例えば、アデノシンデアミナーゼ欠損症、鎌形赤血球貧血の原因遺伝子を挙げることができる。

【0036】核酸プローブとして活性化プロトオンコジーンの全体もしくはその一部の塩基配列に相補的な配列を有するプローブを用いた場合には、癌診断が可能になる。このような活性化プロトオンコジーンとしては、例えば、癌遺伝子データブック（渋谷正史、秀潤社）に記載の癌遺伝子を挙げることができる。

【0037】核酸プローブとしてミニサテライト塩基配列の全体もしくはその一部の塩基配列に相補的な配列を有するプローブを用いた場合には、遺伝学的研究、個人識別、親子鑑定等に有用なDNAフィンガープリント法を行なうことが可能になる。このようなミニサテライト塩基配列としては、例えば、Myo配列、Alu配列、Per-6配列、Per配列を挙げることができる。

【0038】本発明において用いられる核酸プローブの長さは特に限定されるものではなく、数merないし数百merの一本鎖核酸を用いることができるが、S/N比を上げて検出の精度を高めるためには、十数merないし数十mer程度の長さのものが好ましい。これは、次のような理由によるものである。

【0039】上述のように、二本鎖認識体は二本鎖核酸を認識して特異的に結合する物質である。しかしながら、二本鎖認識体は希に一本鎖核酸にも結合することがある。すなわち、担体に固定化された未反応の核酸プローブにも結合する場合がある。このような結合が起こる

10.

20

30

40

50

とS/N比が低下し、検出の精度が悪化する。したがって、核酸プローブの長さは、目的とする遺伝子配列を検出するために最小限必要な長さに止めることが好ましい。

【0040】遺伝子の検出は、上記二本鎖認識体のみならず、核酸プローブを標識することによっても行なうことができる。この場合、核酸プローブに標識される標識剤は、二本鎖認識体と直接もしくは間接的に反応し、もしくはその相互作用により、そのいずれかが検出可能な信号を生じるようなものであればどのような物質でもよい。換言すると、核酸プローブが一本鎖の状態にあるときには信号が発生することはなく、核酸プローブが目的とする遺伝子と反応して二本鎖を形成し、さらにこの二本鎖に二本鎖認識体が結合して初めて信号が発生するような物質が標識剤として用いられる。遺伝子の検出は、この標識剤と二本鎖認識体との反応により生じる信号を測定することにより行なう。このような核酸プローブの標識剤は、用いられる二本鎖認識体により異なるが、例えば、ローダミン、FITCのような蛍光物質、ルミノール、アクリジニウムエステル誘導体のような発光物質、酵素、酵素基質を挙げることができる。二本鎖認識体としては、特に限定されるものではなく、上記のいずれの物質をも使用することができる。

【0041】本発明においては、核酸プローブを固定化する担体として電極もしくは光ファイバーを用いているが、この他に信号の検出が可能な担体として、フォトダイオード、サーミスタ、ISFET、MOSFET、ピエゾ素子、表面弾性波素子、水晶発振器等を用いることもできる。

【0042】本発明で用いる電極は特に限定されるものではなく、使用可能な電極としては、例えばグラファイト、グラシーカーボン、パイロリティックグラファイト、カーボンペースト、カーボンファイバーのような炭素電極、白金、白金黒、金、パラジウム、ロジウムのような貴金属電極、酸化チタン、酸化スズ、酸化マンガン、酸化鉛のような酸化物電極、Si、Ge、ZnO、CdS、TiO₂、GaAsのような半導体電極、チタン等が挙げられる。これらの電極は導電性高分子によって被覆しても良く、これによって安定なプローブ固定化電極を調製することができる。また、単分子膜によって被覆することもできる。核酸プローブは、共有結合、イオン結合、物理吸着等によって電極表面、光ファイバー等の担体上に固定化することができる。

【0043】共有結合による固定化としては、例えば、担体表面を活性化し、その後、直接もしくは架橋剤を介して間接的に核酸プローブを固定化する方法、担体に固定化する核酸プローブに活性型の官能基を導入して担体に直接もしくは間接的に固定化する方法などを挙げることができる。ここで、担体表面の活性化は、例えば、酸化剤中における電解酸化、空気酸化、試薬酸化もしくは

膜で被覆することにより行なうことができる。また、使用し得る架橋剤としては、臭化シアン、γ-アミノプロピルトリエトキシシランのようなシランカップラー、カルボジイミド、塩化チオニル等を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。さらに、核酸プローブに導入される官能基としては、例えばアミノ基、カルボキシル基、ヒドロキシル基、カルボニル基、リン酸基、アルデヒド基、およびメルカプト基を挙げることができるが、これらに限定されるものではなく、その他の反応性が高い官能基を用いることもできる。

【0044】担体表面を活性化するため表面を酸化すると、担体表面に酸化層が形成される。この酸化層を介して核酸プローブと担体とが結合するのであるが、酸化層の厚さを薄くすることにより遺伝子検出におけるS/N比を向上させることができる。酸化層の厚さは、好ましくは500Å（オングストローム）以下、より好ましくは100Å以下である。

【0045】核酸末端への官能基の導入は、酵素反応もしくはDNA合成機を用いて行なうことができる。酵素反応において用いられる酵素としては、例えば、ターミナルデオキシヌクレオチルトランスフェラーゼ、ポリAポリメラーゼ、ポリヌクレオチドカイネース、DNAポリメラーゼ、ポリヌクレオチドアデニルトランスフェラーゼ、RNAリガーゼを挙げることができる。また、ポリメラーゼチェインリアクション（PCR法）、ニックトランスレーション、ランダムプライマー法により官能基を導入することもできる。官能基は、核酸のどの部分に導入されてもよく、3'末端、5'末端もしくはランダムな位置に導入することができる。

【0046】官能基を導入した核酸プローブはそのまま固定化反応により担体上に固定化することができる。しかしながら、核酸プローブは一本鎖核酸であるため、導入した官能基ではなく核酸を構成するアミノ基が官能基として機能する場合がある。すなわち、核酸を構成するアミノ基によってプローブが担体上に固定されてしまう。これは感度の低下を招き、好ましいものではない。

【0047】核酸プローブを構成するアミノ基による固定化は、例えば、次のような方法により防ぐことができる。まず、官能基を導入した核酸プローブを、このプローブと相補的な配列を有するDNA鎖とアニーリングして二本鎖とする。次いで、導入した官能基によりこの二本鎖核酸を担体に固定化し、その後熱変性により一本鎖の核酸にして官能基を導入していないDNA鎖を除去する。熱変性の際の加熱温度は、通常、90～98℃である。

【0048】核酸プローブを固定化しようとする担体が電極である場合には、物理吸着により、より簡単な操作で効率よく核酸プローブを固定化することができる。電極表面への核酸プローブの物理吸着は、例えば、次のように行なうことができる。まず、電極表面を、超音波洗浄器を用いて蒸留水およびアルコールで洗浄する。その

後、電極を核酸プローブを含有するリン酸緩衝液 (pH 7.0) に挿入して核酸プローブを担体表面に吸着させる。この際、電極に 0~+ 1.0V、好ましくは 0~+ 0.1V の範囲で電位を印加することにより、核酸プローブの吸着を促進することができる。次に、核酸プローブを吸着させた電極をヌクレオチド (ATP、CTP、GTP、TTP、dATP、dCTP、dGTP、dTTP 等) 溶液中に挿入し、好ましくは 0~+ 1.0V の範囲で電位を印加しながら、電極表面をヌクレオチドで被覆する。これにより、試料核酸、二本鎖認識体等の電極表面への非特異的な吸着が抑制される。また、非特異的な吸着は、界面活性剤、脂肪酸、脂肪等によっても抑制可能である。

【0049】また、核酸プローブは、酵素固定化の一手法として知られる包括法において使用される包括剤を用いて担体に固定化することもできる。本発明において使用し得る包括剤は特に限定されるものではないが、例えばポリ塩化ビニル、ポリアクリルアミドを挙げることができる。

【0050】さらに、核酸プローブは膜を介して電極表面に固定化することもできる。この際用いられる膜としては、例えば、ポリアセチレン、ポリピロール、ポリチオフェン、ポリアニリンのような導電性高分子、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリビニルクロライド、ポリビニルアルコール、ポリメチルメタクリレート、ポリフッ化ビニリデン、セルロース、脂質膜を挙げることができる。また、LB膜のような単分子膜もしくは単分子膜が複数積層して多層を形成した膜を用いることもできる。核酸プローブの膜への固定化は、担体表面への固定化と同様の方法で行なうことができる。

【0051】共有結合により核酸プローブを膜に固定化する場合には、核酸プローブに官能基を導入する代わりに膜に官能基を導入してもよい。膜に導入される官能基としては、核酸プローブに導入される官能基と同様のものを用いることができる。このように膜に官能基を導入し、次いで核酸プローブを反応させて固定化することにより、核酸プローブに官能基を導入して固定化する場合よりも高い密度でプローブを固定化することができ、かつより安定な核酸プローブ固定化担体を得ることができる。

【0052】膜を介して核酸プローブを固定化する担体が電極である場合には、上述のようにプローブと検体試料とのハイブリダイゼーションを行ない、その前後における膜電位の変化を測定することにより、目的とする遺伝子の存在の有無を検出することができる。

【0053】核酸プローブを固定化した担体は、そのままでは試料核酸、二本鎖認識体等の非特異的な物理吸着が生じやすい。これは、感度の低下を招く要因となる。このような非特異的な吸着は、核酸プローブを固定化した後、担体表面を物理吸着もしくは化学結合により核酸

で被覆することにより抑制することが可能である。

【0054】この際、担体表面を被覆する核酸としては、例えば、アデノシン、チミジン、グアノシン、シチジンのようなヌクレオシド、ウリジル酸、シチジル酸、アデニル酸、グアニル酸のようなヌクレオチド、合成オリゴヌクレオチド、サケ精子DNAのような天然DNAを挙げることができる。

【0055】また、担体表面を被覆する核酸の長さおよび配列は、担体表面に固定化されている核酸プローブと反応しない長さおよび配列であれば特に限定されるものではないが、1~ 100 bp の一本鎖、もしくは二本鎖核酸が望ましい。

【0056】また、非特異的な吸着は、界面活性剤、脂肪酸、脂肪等の物質で被覆することによっても抑制することが可能である。そのような物質としては、具体的には、ステアリルアミン等を用いることができる。

【0057】本発明の遺伝子検出法においては、担体への核酸プローブの固定化は上記方法にのみ限定されるものではなく、一般にタンパク質等の生体高分子の固相への固定化に用いられている方法を広く用いることができる。

【0058】担体に固定化される核酸プローブの量は特に限定されるものではないが、固定化された核酸プローブの密度が高いほど検出の感度が高くなり、S/N比が向上する。固定化される核酸プローブの密度は、通常、平方cm当りアトモル (amol/cm^2) のオーダー以上であり、好ましくは平方cm当りナノモル (nmol/cm^2) のオーダー以上である。

【0059】担体、特に電極もしくは光ファイバー表面に固定化された核酸プローブは、核酸の酸化還元電流もしくは光学的な信号、あるいは一本鎖の核酸に特異的に結合する電気化学的もしくは光学的に活性な物質の酸化還元電流もしくは光学的な信号を測定することにより定量することができる。すなわち、担体が電極である場合には、例えばポテンシオスタット、ファンクションジェネレータ、レコーダ、および計算機からなる測定システムを用いて、核酸もしくは挿入剤に由来する酸化還元電流の計測を行ない、固定化核酸の定量を行なう。また、担体が光ファイバーである場合には、核酸もしくは核酸に結合した挿入剤に由来する光学信号である吸光度、蛍光強度、発光、消光、円偏光二色性、蛍光偏光もしくはその他の光学的情報をそれぞれの信号に対応した測定装置を用いて測定することにより、固定化核酸の定量を行なう。核酸自体には活性がないため、従来行なわれている定量法は非常に複雑なものであったが、この方法によれば担体表面に固定化された核酸を短時間で、簡便かつ高感度に定量することが可能となる。核酸由来の酸化還元電流としては、アデニン、チミン、グアニンもしくはシトシンに由来する酸化還元電流を利用することができる。

【0060】核酸プローブ固定化担体に振動子もしくは回転体としての機能を持たせることにより、担体表面近傍における流体の流れを相対的に増大させることができる。これにより、ハイブリダイゼーション反応の促進、非特異的反応の抑制などが達成され、遺伝子検出の効率を高めることが可能である。振動子としての機能は、例えば、物理的な振動、超音波、電気的もしくは磁気的作用を利用して担体に与えることができる。

【0061】検体試料には、例えば、末梢静脈血のような血液、白血球、血清、尿、糞便、精液、唾液、培養細胞、各種臓器細胞のような組織細胞、その他核酸を含有するものを用いる。検体試料からの核酸の抽出は従来法に準じて行なわれるが、上記二本鎖認識体を用いて以下の手順により抽出、精製することもできる。

【0062】まず、二本鎖認識体を適当な担体上に固定化し、この担体を検体試料と混合する。次に検体試料中の細胞を破壊して核酸を遊離させ、この核酸と二本鎖認識体とを結合させる。その後、担体を検体試料から分離し、さらに二本鎖認識体に結合した核酸を担体から分離する。

【0063】ここで用いられる担体は特に限定されるものではなく、例えば、ラテックス、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリプロピレン等の高分子からなる担体、活性炭等の炭素系材料、金属粒子、セラミック、マグネタイト、サマリウム-コバルト、フェライト等の磁性体を挙げることができる。担体の形態も特に限定されるものではないが、粒径 0.1~1000 μm 、特に 1~100 μm の粒子であることが好ましい。

【0064】検体試料中の細胞の破壊は、常法により行なえばよく、例えば、振とう、超音波等の物理的作用を外部から加えて担体を振動させて行なう。また、核酸抽出溶液を用いて、細胞から核酸を遊離させることもできる。核酸溶出溶液の例としては、SDS、Triton-X Tween-20のような界面活性剤、サポニン、EDTA、プロテアーゼ等を含む溶液を挙げることができる。これらの溶液を用いて核酸を溶出する場合には、37°C以上の温度でインキュベートすることにより反応を促進することができる。

【0065】担体に固定化された二本鎖認識体と核酸とを結合させた後、適当な手段により検体試料から担体を分離する。分離した担体は、まず洗浄液（低塩濃度）で洗浄して不要成分を除去し、次いで核酸溶出液（高塩濃度）で担体から溶液中に核酸を溶出する。二本鎖認識体として挿入剤を用いた場合には、核酸溶出液として非極性有機溶媒を用いる。担体として磁性粒子を用いた場合には、担体の振動および分離操作を外部からの磁気作用により簡便かつ迅速に行なうことが可能となり、好都合である。

【0066】目的とする遺伝子の含有量が微量である場合には、公知の方法により遺伝子を増幅した後検出を行

なうこともできる。遺伝子を増幅する方法としては、ポリメラーゼチェーンリアクション（PCR）等の酵素を用いる方法が代表的なものである。ここで、遺伝子増幅法に用いられる酵素としては、例えば、DNAポリメラーゼ、TaqポリメラーゼのようなDNA依存型DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼIのようなDNA依存型RNAポリメラーゼ、Q β レプリカーゼのようなRNA依存型RNAポリメラーゼを挙げることができる。なかでも、Taqポリメラーゼを用いるPCR法は温度を調節するだけで連続して増幅を繰り返すことができ、非常に有用な方法である。

【0067】このようにして得られたサンプル（核酸の粗抽出液あるいは精製した核酸溶液）は、まず90~98°C、好ましくは95°C以上の温度で熱変性し、一本鎖核酸を調製する。次いで、この一本鎖核酸溶液中に核酸プローブ固定化電極あるいは核酸プローブ固定化光ファイバーを挿入し、37~72°Cの範囲でハイブリダイゼーション反応を行なう。ハイブリダイゼーション反応の最適温度は、用いるプローブの塩基配列、長さ等により異なる。

【0068】この場合のハイブリダイゼーション反応は固相での反応であるため、溶液中における反応よりも反応速度でやや劣る。しかしながら、核酸プローブ固定化電極を用いる場合には、ハイブリダイゼーション反応前および/または反応時に電極表面に電位を印加しておくことによりハイブリダイゼーション反応を促進することができ、この問題を解決することが可能である。印加する電圧はプラス電位のみであるか、あるいはプラス電位とマイナス電位とを交互に印加することが好ましく、連続的に、もしくはパルスのように断続的に印加する。また、印加する電位は、0~ \pm 2.0Vであることが好ましい。

【0069】ハイブリダイゼーションの際に、核酸プローブに結合した目的遺伝子の他に、未反応の核酸が非特異的に電極表面に吸着することがある。これは、遺伝子検出のS/N比を劣化させる要因となる。核酸は、通常マイナスに荷電しているため、ハイブリダイゼーション終了後、電極にマイナスの電化を印加することにより非特異的に吸着している核酸を除去することができる。この際印加する電位は、0~2.0V、好ましくは0~1.5Vであることが好ましい。

【0070】二本鎖認識体は、ハイブリダイゼーション反応前に検体試料中に添加することもできるし、反応後に添加することもできる。また、予め二本鎖認識体の溶液を調製しておき、ハイブリダイゼーション終了後、核酸プローブ固定化電極または光ファイバーをこの溶液に挿入してもよい。二本鎖認識体にはプラスに荷電している物質が多いので、担体が電極である場合には、プラスの電位を印加することにより担体への二本鎖認識体の非特異的な吸着を抑制することができる。

【0071】電極反応は電極表面においてしか起こらな

10

20

30

40

50

いことから、ハイブリダイゼーションした場合にのみ、二本鎖核酸に結合した挿入剤の電極応答が得られる。核酸プローブ固定化電極を用いた場合には、ポテンシオスタット、ファンクションジェネレータ、レコーダからなる測定システムを用いる。電位を挿入剤の酸化還元電位前後に設定し電位を走査する。このとき、酸化還元電流を測定し検出遺伝子の定量を行なう。この電気化学的測定は、被検溶液中または他の電解液中の何れで行なっても良い。また、親水性溶媒中または疎水性溶媒中を行なってもよい。

【0072】核酸プローブ固定化光ファイバーを用いた場合には吸光度、発光、蛍光、反射光、消光、円偏光二色性、蛍光偏光などの光学的情報を測定することで検出遺伝子の定量を行なう。

【0073】上述の核酸プローブ固定化電極もしくは核酸プローブ固定化光ファイバーのように、信号検出機能を有する担体に核酸プローブを固定化した装置は、遺伝子検出センサとして有用である。これらの装置を、遺伝子検出センサとして繰り返し使用するためには、測定後に、固定化したプローブとハイブリダイズしたサンプルを解離させなければならない。プローブからのサンプルの解離は、熱処理、アルカリ処理、酸処理、界面活性剤処理、または超音波処理により行なうことができる。熱処理は、98℃で5分間処理してサンプルを変性させ、その後急冷すれば良い。アルカリ処理は、pH 8.5以上の緩衝液もしくは強アルカリ液で処理することにより、また酸処理は、pH 4.5以下の緩衝液もしくは強酸液で処理することにより行なうことができる。界面活性剤処理に使用し得る界面活性剤は特に限定されるものではなく、例えばSDS、トライトン-X、ツイーン20等のイオン性もしくは中性界面活性剤を利用することができる。この際の界面活性剤の濃度は、0.1%以上であることが望ましい。超音波処理は、10 KHzないし100 KHzの周波数で数秒ないし数分間処理することにより行なうことができる。本発明は、さらに、上述の遺伝子検出センサを用いた、特定の遺伝子配列を検出する自動遺伝子検出装置を提供する。本発明による自動遺伝子検出装置は、電極もしくは光ファイバーの表面上に核酸プローブを固定化した遺伝子検出センサと、遺伝子検出センサを移動させるための移動手段と、

【0074】一本鎖に変性された遺伝子サンプルを含有する試料溶液を貯留し、遺伝子サンプルと遺伝子センサの表面に固定化された核酸プローブとのハイブリダイゼーションにより遺伝子センサ上に二本鎖核酸を形成するための反応槽と、試料溶液の温度を制御する温度制御手段と、遺伝子サンプルとのハイブリダイゼーションの後、遺伝子センサを洗浄して未反応の遺伝子サンプルを除去するための洗浄手段と、

【0075】二本鎖認識体を含有する溶液を貯留し、二本鎖認識体と遺伝子センサ表面上に形成された二本鎖核

酸とを反応させることにより二本鎖認識体を二本鎖核酸に結合させ、結合した二本鎖認識体が生ずる電気化学的もしくは光学的な信号を検出するための検出槽とを具備することを特徴とする。

【0076】本発明による自動遺伝子検出装置に用いられる遺伝子センサとしては、前述の核酸プローブ固定化電極もしくは光ファイバーのいずれをも好適に用いることができる。この遺伝子センサには、例えばバドル状の形状にして攪拌子の機能を持たせることができ、また、温度センサの機能を持たせることも可能である。

【0077】遺伝子センサにより検出された電気化学的もしくは光学的な信号は、直接もしくは適当な制御装置を介して測定し、さらに計算機等を用いて解析することができる。

【0078】反応槽には一本鎖に変性された遺伝子サンプルを含有する試料溶液が貯留される。この試料溶液としては、被検細胞を破碎した後の核酸粗抽出液をそのままか、あるいはこの核酸粗抽出液を精製した精製核酸抽出液を用いればよい。このような核酸粗抽出液もしくは精製核酸抽出液を調製することができる試料溶液調製装置を反応槽に連結し、被検細胞からその場で調製した試料溶液を反応槽に送ることもでき、その結果、被検細胞からの遺伝子の検出を全自動的に行なうことが可能となる。試料溶液調製装置は、例えばディスポーザブルなカートリッジタイプとし、測定終了後に新しいカートリッジに交換するようにしてもよい。着脱自在なカートリッジタイプを採用することにより、洗浄の手間をかけることなく、常に清浄な状態で試料溶液を調製することが可能となる。

【0079】本発明による自動遺伝子検出装置は、さらに、遺伝子センサ表面上に形成された二本鎖核酸を、遺伝子センサ表面上に固定化された核酸プローブと一本鎖遺伝子サンプルとに解離し、遺伝子サンプルを除去して遺伝子センサを再生するための解離手段を具備することができる。このような解離手段を有することにより、遺伝子センサを繰り返し使用することが可能となり、検出装置を自動化する上で非常に望ましい。本発明による自動遺伝子検出装置において用いることができる解離手段としては、上述の熱処理、アルカリ処理、酸処理、界面活性剤処理、または超音波処理のいずれをも用いることができる。

【0080】さらに、本発明による自動遺伝子検出装置においては、異なる核酸プローブを固定化した複数の遺伝子センサを用いることもできる。これら複数の遺伝子センサの全てを同時に用いて複数の項目を同時に測定することも、また、いくつかの遺伝子センサを指定して検出しようとする項目を選択して測定することもできる。以下、本発明による自動遺伝子検出装置を用いた遺伝子の検出方法を、図面を参照して説明する。

【0081】図1は、本発明による自動遺伝子検出装置

の一具体例を模式的に示す図である。この装置は、反応槽 2、検出槽 9および解離処理槽 11 の3種類の槽を有している。反応槽 2は温度コントローラ 3に嵌合され、廃液タンク 10 に接続されており、さらに移動レール 4により水平方向に移動可能となっている。反応槽 2は、移動レール 4上の所定の位置において遺伝子サンプル精製装置 1と接続する。遺伝子センサ 5は、移動装置 12に固定されており、この移動装置 12により各槽上方の所定の位置への水平移動および各槽の内部への上下移動が行なわれる。遺伝子センサ 5としては核酸プローブ固定化電極が用いられており、これにより検出された電気信号は、電気信号検出制御装置 6を介して計算機 7に入力され、信号の解析が行なわれる。

【0082】次に、この装置を用いた遺伝子検出方法について説明する。まず、検出しようとする核酸を含む被検細胞を遺伝子サンプル精製装置 1に入れ、一本鎖に変性された遺伝子サンプルを含有する試料溶液を調製する。調製した試料溶液を反応槽2に送り、その後、反応槽 2を、移動レール 4上を所定の位置まで移動させる。次に、遺伝子センサ 5を反応槽 2の上方に水平移動させた後、反応槽 2内に移動させる。遺伝子センサ 5が反応槽 2内の試料溶液中に浸漬した後、温度コントローラ 3により試料溶液を適温に制御して、遺伝子センサ 5の表面に固定されている核酸プローブと試料溶液に含有される遺伝子サンプルとのハイブリダイゼーションを行なう。反応終了後、遺伝子センサ 5を試料溶液から引き上げ、洗浄液タンク 8から送られる洗浄液により洗浄して未反応の核酸プローブを除去した後、検出槽 9の上方に水平移動させる。遺伝子センサ 5を引き上げた後の反応槽 2は、再び遺伝子サンプル精製装置 1に接続する位置に移動し、内部に貯留する試料溶液を廃液タンクに排出する。検出槽 9上に移動した遺伝子センサ 5は、次いで検出槽 9内部に移動する。検出槽 9の内部には二本鎖認識体を含む溶液が貯留されており、この二本鎖認識体が、溶液中に浸漬した遺伝子センサ 5の表面に形成された二本鎖核酸を認識して結合する。結合した二本鎖認識体が発する電気化学的信号は、遺伝子センサ 5により検出され、電気信号検出制御装置 6により制御された後計算機 7に入力されて解析される。測定後、遺伝子センサ 5を検出槽 9から引き上げ、解離処理槽 11内部に移動させる。解離処理槽 11では、遺伝子センサ 5の表面上に形成された二本鎖の解離が行なわれ、遺伝子センサ 5が再生される。

【0083】前述の反応槽 2は必ずしも単一の槽に限られるものではなく、図2に示すように、複数の小槽 13を組み合わせたものを用いることができる。このような反応槽と複数の遺伝子センサ 5を用いることにより、複数のサンプルを同時に測定することが可能となる。また、この際、それぞれ独立した、小槽 13と同数の遺伝子サンプル精製装置 1を組み合わせて複数のサンプルを

同時に調製することにより、より効率よく測定を行なうことができる。

【0084】また、未反応の核酸サンプルおよび二本鎖認識体を除去することなく測定を行なうことも可能である。その際には、洗浄液タンク 8および検出槽 9は必要なく、測定までの全ての操作を反応槽 2中で行なう。

【0085】さらに、反応槽 2は、核酸プローブ固定化担体を備えたディスポーザブルな反応セルとすることもできる。この反応セルは、その内部底面もしくは側面に核酸プローブ固定化担体を備えている。ここで用いられる固定化担体としては、上述のいずれの固定化担体をも使用することができるが、検出装置本体との接続を考慮すると、核酸プローブ固定化電極であることが好ましい。固定化担体は、反応セルから分離可能であるように設置し、繰り返し用いるようにしてもよい。

【0086】この反応セルを用いた遺伝子の検出は次の通りに行なう。まず、検出しようとする核酸を含む試料溶液を反応セル内に入れ、セル全体を加熱して核酸を一本鎖に変性させる。次に、用いるプローブに応じた温度でアニリングを行なって二本鎖を形成させた後、二本鎖認識体を添加し、それにより直接もしくは間接的に発生する信号を反応セルに設けられた担体を通して測定する。この場合には、反応セル自体が核酸プローブ固定化担体を備えているので、上述の遺伝子センサを使用する必要はない。

【0087】この反応セルは、1回の測定を終える度に検出装置より取り外して廃棄する。したがって、サンプル同志のクロスコンタミネーション、キャリアオーバー等のない信頼性の高い遺伝子の検出が可能となる。また、反応セルを洗浄する必要がないので、より簡便に短時間で測定を行なうことができる。

【0088】反応槽 2の温度を制御する温度コントローラ 3は、図3に示すように、恒温槽21、この恒温槽21の温度を制御するコントローラ22および試料溶液の温度を測定する温度センサ23を具備している。図3において、恒温槽21内に設置された反応槽 2は、上記の複数の小槽 13を組み合わせたものである。複数の小槽13のうちの1つには、試料溶液と同じ組成を有する緩衝液が入れられ、その液中に温度センサ23が挿入される。この緩衝液の温度が試料溶液の温度として測定される。温度センサ23はコントローラ22に接続しており、反応槽 2内の緩衝液の温度を測定してその情報をコントローラ22に送る。温度センサ23からの温度情報を受け取ったコントローラ22は、その情報を演算処理し、試料溶液が常に所定の温度を保つように恒温槽21の温度を制御する。この温度制御は、 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ の範囲で行なわれることが好ましい。次に、電気化学発光を利用する自動遺伝子検出装置の例を説明する。

【0089】図4は、電気化学発光を利用する自動遺伝子検出装置を模式的に示す図である。この装置は、図1

に示す検出装置における反応槽および検出槽の両者の機能を備えた反応セル 32 と、洗浄槽 42 とを有している。上述のように、電気化学発光を利用する場合には、未反応の核酸プローブおよび未反応の挿入剤を除去することなく測定を行なうことができるので、独立した反応槽および検出槽を具備する必要はない。反応セル 32 の底面には核酸プローブ固定化電極 33 が設けられている。また、図 1 に示す検出装置の反応槽と同様に、温度コントローラ 34 に嵌合されている。さらに、移動レール 35 により水平方向に移動可能であり、この移動レール 35 上の所定の位置において遺伝子サンプル精製装置 31 に接続する。参照電極 36 は光ファイバ 37 の端部と共に、移動装置 12 に固定されている。この移動装置 12 により、参照電極 36 および光ファイバ 37 の各槽上方への水平移動および各槽内部への上下移動が行なわれる。参照電極 36 は、核酸プローブ固定化電極 33 と共にファンクションジェネレータ/ポテンシオスタット 38 に接続されている。これらの電極間に印加する電圧の制御は、計算機 39 により行なう。核酸プローブ固定化電極 33 の表面で生じた電気化学発光は、光ファイバ 37 を介してフォトマル 40 に送られて増幅され、フォトンカウンタ 41 で計測される。測定結果は計算機 39 に入力され、解析される。

【0090】この装置を用いた遺伝子の検出は、次のように行なう。まず、上述の図 1 に示す装置の場合と同様に、検出しようとする核酸を含む被検細胞を遺伝子サンプル精製装置 31 に入れて一本鎖に変性された遺伝子サンプルを含有する試料溶液を調製し、これを反応セル 32 に移す。次に、温度コントローラ 34 により試料溶液を適温に制御して、核酸プローブ固定化電極 33 の表面に固定されている核酸プローブと試料溶液中の遺伝子サンプルとのハイブリダイゼーションを行なう。この際、試料溶液中に、電気化学発光を生ずる挿入剤を添加する。挿入剤は、予め試料溶液中に添加しておくこともできる。次いで、移動レール 35 を用いて反応セル 32 を所定の位置まで移動させ、さらに、反応セル 32 の内部に参照電極 36 および光ファイバ 37 を移動させて試料溶液中に浸漬する。その後、参照電極 36 と反応セル 32 内に設けられた核酸プローブ固定化電極 33 との間に印加し、電気化学発光を行なう。電気化学発光により生じた光は光ファイバ 37 を介してフォトマル 40 に導き、増幅した後フォトンカウンタ 41 において計測する。計測の結果は計算機 39 に入力し、解析する。測定後、参照電極 36 および光ファイバ 37 を反応セル 32 から引き上げ、洗浄槽 42 に移動して洗浄する。

【0091】上記検出方法においては、安全性および簡便性に優れ、かつ短時間で目的とする遺伝子の有無を高感度に検出することができる遺伝子検出法を提供することを目的として、挿入剤が発する電気化学的もしくは光学的な信号を検出することができる電極、光ファイバ

等の担体に核酸プローブを固定化して遺伝子センサとして用いている。この目的は、核酸プローブ固定化電極もしくは核酸プローブ固定化光ファイバの代わりに、核酸プローブを粒子表面に固定化した核酸プローブ固定化粒子を用いることによっても達成される。すなわち、粒子表面において核酸プローブと遺伝子サンプルとのハイブリダイゼーションにより二本鎖核酸を形成し、これに電気化学的もしくは光化学的に活性な二本鎖認識体を結合させて、検出器により二本鎖認識体を電気化学的もしくは光学的に検出すればよい。

【0092】核酸プローブを固定化する粒子は特に限定されるものではなく、例えば、ラテックスビーズ、ポリスチレンビーズ、ガラスビーズ、磁性体粒子等を挙げることができる。また、用いる粒子の直径は、100Å（オングストローム）ないし 1mm 程度の範囲にあることが好ましい。その他の条件は、上記核酸プローブ固定化電極もしくは光ファイバを用いる場合の条件をそのまま適用することができる。

【0093】同様に、フィルター表面に核酸プローブを固定化した核酸プローブ固定化フィルターを用いて遺伝子の検出を行なうこともできる。この際用いられるフィルターは、少なくとも 100℃の温度で変性しない材質のものであれば特に限定されるものではなく、例えば、ニトロセルロースフィルターやナイロンフィルターのような DNA のサザンブロッティングに通常用いられるフィルターを使用することができる。このフィルターへの核酸プローブの固定化には、担体への核酸プローブの固定化方法として上に説明した方法をそのまま適用することができる。核酸プローブ固定化フィルターを用いた遺伝子の検出は、次のようにして行なうことができる。

【0094】まず、末梢静脈血、各種臓器細胞等の検体試料から従来法に準じて核酸を抽出し、必要であれば精製する。次に、得られた核酸試料を含有するハイブリダイゼーション反応液を調製し、この反応液を核酸プローブ固定化フィルターを含む複数のフィルターからなる多層構造のフィルター装置に添加し、サンプルをフィルター装置内部に浸透させる。このハイブリダイゼーション反応液中には、予め二本鎖認識体、特に直接もしくは間接的な光学活性を有する二本鎖認識体を含有させておく。反応液が十分に浸透した後、95℃で核酸を熱変性して一本鎖とし、さらに 37～72℃で加熱して一本鎖核酸とフィルター表面上に固定化された核酸プローブとのハイブリダイゼーションを行なう。反応後、フィルター装置から核酸プローブ固定化フィルターを取り外し、洗浄する。核酸試料中に目的とする遺伝子が存在する場合には、核酸プローブ固定化フィルター上に二本鎖が形成され、この二本鎖核酸に二本鎖認識体が結合している。この二本鎖認識体に起因する信号の変化を測定することにより目的遺伝子の定量を行なう。すなわち、二本鎖認識

体が光学活性を有している場合には、発光、蛍光、反射光、蛍光偏光、消光、円偏光二色性等の光学的な信号の変化を測定すればよい。

【0095】また、上記検出方法においては、担体上に固定化された核酸プローブに結合した目的遺伝子を二本鎖認識体を用いて検出しているが、目的遺伝子自体に標識剤をラベルすることにより二本鎖認識体を用いずに検出することも可能である。これは、例えば、検出の前処理として検体試料中の目的遺伝子の増幅を行ない、その際、増幅に使用されるプライマーもしくは原料ヌクレオチドを上述の電極活性物質、光学活性物質のような標識剤でラベルすればよい。これにより、増幅された遺伝子には標識剤が取り込まれ、目的遺伝子それ自体が標識剤でラベルされることになる。ここで用いられる標識剤は特に限定されるものではなく、生体高分子および挿入剤にさらに結合し得る標識剤として上に列挙した物質を用いることができる。このような、それ自体標識剤でラベルされた遺伝子の検出は、二本鎖認識体を用いないこと以外は、上述の検出方法と全く同様の方法で行なうことができる。

【0096】さらに、担体に固定化した第1のプローブの他に第2のプローブを用いて、いわゆるサンドイッチハイブリダイゼーションを行なうことにより、二本鎖認識体を用いることなく目的遺伝子の検出を行なうことができる。すなわち、担体に固定化した第1のプローブと目的遺伝子との第1のハイブリダイゼーションを行ない、次いで、標識剤でラベルした第2のプローブを添加して担体上に固定化された目的遺伝子との第2のハイブリダイゼーションを行ない、第2のプローブにラベルされた標識剤からの信号を検出すればよい。

【0097】ここで用いられる第2のプローブは、検出しようとする目的遺伝子に相補的な塩基配列を有する核酸であればどのようなものでもよく、目的遺伝子が第1のプローブと相補的な塩基配列を複数有するのであれば、第1のプローブを第2のプローブとして使用することもできる。

【0098】第2のプローブにラベルする標識剤は特に限定されるものではなく、生体高分子および挿入剤にさらに結合し得る標識剤として上に列挙した物質を用いることができる。

【0099】この遺伝子検出方法は、担体に固定化された第1のプローブと目的遺伝子とのハイブリダイゼーションまでは、上述の二本鎖認識体を用いる検出法と同様に行なうことができる。第1のプローブと目的遺伝子とが結合した後、二本鎖認識体の代わりに第2のプローブを添加し、第1のハイブリダイゼーションと同様の条件の下で第2のハイブリダイゼーションを行なう。第2のプローブは、第1のハイブリダイゼーションを行なう前に添加することもできる。第2のハイブリダイゼーションが終了した後、第2のプローブに導入した標識剤に

じた方法で遺伝子の検出を行なう。具体的には、二本鎖核酸に結合した二本鎖認識体を検出する方法をそのまま用いることができる。

【0100】ところで、遺伝病には、遺伝子において、特定の塩基配列が欠如したり、複数の特定の塩基配列が存在して初めて発現するような疾患が多数存在する。すなわち、遺伝病に関しては、核酸プローブを用いて直接検出が可能な疾患は少数である。その結果、大多数の疾患は制限酵素切断断片鎖長多型(RFLP)解析法を用いて検出が行われている。このRFLP法はDNA断片のパターンを解析する手法であり、DNA断片を分離する操作が必要である。このDNA断片の分離には、現在電気泳動のみが用いられているが、電気泳動を用いる方法は操作が繁雑となり、しかも測定に長時間を要するという欠点が存在する。このようなDNA断片のパターン解析を、この発明の遺伝子検出法を用いて、以下の手順により、簡便かつ短時間で行なうことが可能である。

【0101】まず、生物試料からDNAを抽出した後、適当な制限酵素で消化する。ここで用いられる制限酵素は特に限定されるものではなく、RFLPにおいて通常用いられる酵素を使用することができる。使用することができる制限酵素の例としては、Acc I、Ava I、BamH I、EcoR I、Hinc II、Hind III、Pst Iを挙げることができる。

【0102】得られたDNA断片は、カラムクロマトグラフィ、高速液体クロマトグラフィ(HPLC)、キャピラリー電気泳動、ゲル電気泳動等により、分子量の差に基づいて分離する。このような分離手段の例としては、FPLC(ファルマシア社製)を挙げるすることができる。

DNA断片の分離は、DNA断片を、例えば90~98℃に加熱して、一本鎖に変性した後に行なってもよい。

【0103】次に、分子量の差に基づいて分離したDNA断片と、核酸プローブ固定化担体とのハイブリダイゼーションを行なう。このハイブリダイゼーション反応は、一定流速のフロー系で行なうか、もしくは一定量ずつ分取した画分において行なう。

【0104】ハイブリダイゼーションをフロー系で行なう場合には、移動相の温度、pH等をハイブリダイゼーション反応に適した条件に設定する。ここで、移動相の組成は特に限定されるものではないが、塩濃度が0~1M程度、pHが中性領域、温度が37~72℃の範囲であることが好ましい。二本鎖認識体はサンプル溶液中に添加しておくことが好ましいが、ハイブリダイゼーションの後、表面上に二本鎖が形成された担体を二本鎖認識体が含まれる溶液中に挿入してもよい。二本鎖認識体は上述のいずれのものをも使用することができ、特に限定されるものではない。フロー系においては、サンプル溶液の導入から、二本鎖認識体由来する直接的もしくは間接的な信号が得られるまでの時間(保持時間)を測定する。この結果から、RFLP等によるパターン解析を行

なうことができる。

【0105】また、画分を分取した後にハイブリダイゼーションを行なう場合には、各画分において核酸プローブ固定化担体とのハイブリダイゼーションを行なった後、画分中に二本鎖認識体を添加して二本鎖認識体由来する直接的もしくは間接的な信号の測定を行なう。信号が得られた画分のフラクションナンバーから、RFLP等によるパターン解析を行なうことができる。

【0106】上述のように、この発明は特定の塩基配列を有する遺伝子の存在の有無を検出するための方法であるが、この方法を利用すると、さらに特定の塩基配列を有する遺伝子を分離することが可能となる。すなわち、上記検出方法においては、目的遺伝子は核酸プローブとのハイブリダイゼーションにより担体上に固定化されているので、単に担体を検体から取り出すだけで検体から目的遺伝子を分離することができる。したがって、担体を取り出した後、適当な手段を用いて目的遺伝子を担体から分離させることにより目的遺伝子のみを分離することが可能となる。

【0107】より詳細に説明すると、この遺伝子分離方法は、まず担体表面上に固定化される核酸プローブと目的とする遺伝子とのハイブリダイゼーションを行なって二本鎖核酸を形成させ、この二本鎖核酸に、予めもしくはハイブリダイゼーションの後に添加された二本鎖認識体を結合させた後、この二本鎖核酸に結合した二本鎖認識体由来する信号を検出して目的遺伝子の存在の有無を確認する。次いで、目的遺伝子の存在が確認された担体について、担体を検体から引き上げて目的遺伝子を検体から分離し、さらに熱もしくはアルカリによって変性して担体から目的遺伝子を分離させる。この遺伝子分離方法においては、検体中の目的遺伝子の検出までは上述の遺伝子検出方法と全く同様である。

【0108】担体から目的遺伝子を分離させるためには、バッファー中において95℃以上に加熱するか、もしくは水酸化ナトリウム等でアルカリ性にすればよい。この操作により、目的とする遺伝子を一本鎖の形態で分離したことになる。

【0109】このようにして得られた遺伝子について、酵素を用いて相補鎖合成し、二本鎖を形成することができる。また、酵素を用いて増幅することにより、収量を増大させることもできる。特に、PCR法によれば、収量増大と同時に二本鎖を形成することが可能である。さらに、二本鎖を形成した後リンカーを介してベクターに組み込むことにより、効率的にかつ簡便に、目的とする遺伝子をクローニングすることができる。

【0110】

【作用】本発明に係る遺伝子検出法では、二本鎖を形成した核酸プローブと目的遺伝子との間に結合した二本鎖認識体を、電気化学的あるいは光化学的な測定するだけで目的遺伝子の定量を行なうことができる。また、放射

性同位元素を遺伝子プローブのラベル剤として用いる従来法と同程度の感度が得られる。しかも、放射性同位元素を使用しないので、安全、簡便かつ短時間で、正確な遺伝子の検出が可能になる。

【0111】また、本発明に係る遺伝子検出装置は、上記遺伝子検出法に従って遺伝子の検出を行なう装置である。本装置は、放射性同位元素を遺伝子プローブのラベル剤として用いる従来法と同程度の感度が得られ、また、放射性同位元素を使用しないので安全かつ簡便であって、短時間で正確に遺伝子を検出することが可能である。さらに、全操作を自動的に行なうことができるので、大量のサンプルを処理することができる。

【0112】

【実施例】以下に、本発明による遺伝子検出方法の実施例を説明する。

実施例1：核酸プローブ固定化電極を用いた遺伝子の検出

(1) Pt電極表面への核酸プローブの固定化

【0113】白金電極を高温処理し、電極表面を空気酸化した。次に、臭化シアン(CNBr)によって酸化被膜の表面を活性化した後、熱変性した一本鎖核酸プローブ(v-myc)溶液に浸すことによって固定化を行なった。

(2) 核酸プローブ固定化電極を用いた遺伝子の検出

【0114】検体試料にはpUC 119のPst I Siteにv-myc断片を挿入したpVM 623を使用した。pVM 623をHind IIIで消化することでリニアにし、98℃で熱変性させた。次に、核酸プローブ固定化電極を検体試料中に挿入し、70℃で15分間インキュベートすることによってアニーリング反応を行なった。その際、二本鎖DNAに特異的で且つ電気化学的に活性な挿入剤であるアクリジンオレンジを添加した。

【0115】アニーリング反応後に電極反応を行ない、このとき流れる酸化還元電流を測定することによって検体試料中に含まれるv-mycを定量した。その結果、v-mycをpgオーダーで検出することができた。

実施例2：核酸プローブ固定化光ファイバーを用いた遺伝子検出

(1) 光ファイバーへの核酸プローブの固定化

【0116】光ファイバーの先端部分をシラン剤(γ-アミノプロピルトリエトキシシラン：γ-APTES)で処理した後、グルタルアルデヒドを架橋剤として一本鎖核酸プローブ(v-myc)を固定化した。

(2) 核酸プローブ固定化光ファイバーを用いた遺伝子検出

【0117】検体材料にはpUC 119のPst I Siteにv-myc断片を挿入したpVM 623を使用した。pVM 623をHind IIIで消化することでリニアにし、98℃で熱変性させた。次に、核酸プローブ固定化光ファイバーを検体試料中に挿入し、70℃で15分間インキュベートすることによ

り、アニーリング反応を行なった。その際、二本鎖のDNAに特異的であるアクリジンを添加した。

【0118】アニーリング反応の後、アクリジンの発する蛍光を測定することにより、検体試料中に含まれるv-mycを定量した。その結果、v-mycをpgオーダーで検出することができた。

実施例3：核酸プローブ固定化電極を用い、メタロインターカレーターを挿入剤とする遺伝子検出

【0119】検体試料にはpUC 119のPst I Siteにv-myc断片を挿入したpVM 623を使用した。pVM 623をHind IIIで消化することでリニアにし、98°Cで熱変性させた。次に、核酸プローブ固定化電極を検体試料中に挿入し、70°Cで15分間インキュベートすることによってアニーリング反応を行なった。その際、二本鎖核酸に特異的で且つ電極活性を有する挿入剤であるトリス(1,10-フェナントロリン)コバルト(III)を添加した。

【0120】アニーリング反応後にサイクリックボルタメトリを行ない、30回掃引することにより酸化還元電流値を積算した。その結果、v-mycをpgオーダーで検出することができた。

実施例4：核酸プローブ固定化光ファイバ電極を用い、電気化学発光を利用した遺伝子検出

【0121】検体試料にはpUC 119のPst I Siteにv-myc断片を挿入したpVM 623を使用した。pVM 623をHind IIIで消化することでリニアにし、98°Cで熱変性させた。次に、核酸プローブ(v-myc)固定化光ファイバ電極を検体試料中に挿入し、70°Cで15分間インキュベートすることによってアニーリング反応を行なった。その際、二本鎖核酸に特異的で且つ電気化学発光を生ずるルシゲンを添加した。

【0122】アニーリング反応後に電気化学的な反応を行ない、核酸プローブ固定化光ファイバ電極を通して発光を検出した。その結果、v-mycをpgオーダーで検出することができた。

実施例5：核酸プローブ固定化電極を用い、抗DNA抗体を挿入剤とする遺伝子検出

(1) Pt電極表面への核酸プローブの固定化

【0123】白金電極を高温処理し、電極表面を空気酸化した。次に、臭化シアン(CNBr)によって酸化被膜の表面を活性化した後、熱変性した一本鎖核酸プローブ(v-myc)溶液に浸すことによって固定化を行なった。

(2) 核酸プローブ固定化電極を用いた遺伝子の検出

【0124】検体試料にはpUC 119のPst I Siteにv-myc断片を挿入したpVM 623を使用した。pVM 623をHind IIIで消化することでリニアにし、98°Cで熱変性させた。次に、核酸プローブ固定化電極を検体試料中に挿入し、70°Cで15分間インキュベートすることによってアニーリング反応を行なった。洗浄後、二本鎖核酸に特異的に結合するアルカリホスファターゼ結合抗核酸抗体を反応

させ、さらに洗浄した後NADP+溶液を添加した。アルカリホスファターゼはNADP+を加水分解してNAD+を生じる。

【0125】このNAD+を、アルコールデヒドロゲナーゼおよびジアホラーゼを用いる系でNADHの酸化によって流れる電流を測定することにより測定し、検体試料中に含まれるv-mycを測定した。その結果、v-mycをpgオーダーで検出することができた。

実施例6：核酸プローブ固定化光ファイバを用い、抗DNA抗体を挿入剤とする遺伝子検出

(1) 光ファイバーへの核酸プローブの固定化

光ファイバーの先端部分をシラン剤(γ -APTES)で処理した後、グルタルアルデヒドを架橋剤として一本鎖核酸プローブ(v-myc)を固定化した。

(2) 核酸プローブ固定化光ファイバーを用いた遺伝子検出

【0126】検体材料にはpUC 119のPst I Siteにv-myc断片を挿入したpVM 623を使用した。pVM 623をHind IIIで消化することでリニアにし、98°Cで熱変性させた。次に、核酸プローブ固定化光ファイバーを検体試料中に挿入し、70°Cで15分間インキュベートすることにより、アニーリング反応を行なった。

【0127】アニーリング反応の後、洗浄し、二本鎖DNAに特異的に結合するペルオキシダーゼ結合抗DNA抗体を反応させた。その後、再び洗浄し、基質としてルミノールおよびエンハンサーとしてルシフェリンを用い、アルカリ水溶液中で H_2O_2 と反応させた。これにより生ずる発光を測定することにより、検体試料中に含まれるv-mycを定量した。その結果、v-mycをpgオーダーで検出することができた。

参考例1：BPPG電極上の核酸プローブの定量

(1) アミノ基の核酸プローブへの導入

【0128】DNAラベリングキットであるChemiprobeを用いてラベルした発癌遺伝子v-myc(1.5 Kb)の3'末端に、ターミナルデオキシヌクレオチルトランスフェラーゼを用いて(6-アミノヘキシル)dATPを導入した。

(2) 電極表面への核酸プローブの固定化

【0129】核酸を固定化するための電極としては、ベーサルブレインバイロリティックグラファイト(BPPG)を用いた。この電極を、10%硝酸、2.5%クロム酸カリウム溶液において2.2Vで電気分解することにより表面を酸化した。次いで、表面酸化した電極を10% γ -アミノプロピルトリエトキシシランのトルエン溶液中において120°Cで30分間還流することによりシラン化した。これをメタノールで洗浄した後、1%グルタルアルデヒド溶液中で30分間反応させ、再び洗浄した。次に、この電極を、アミノ基を導入したv-myc 1 μ g/mlの溶液中において室温で30分間反応することにより核酸プローブ固定化電極を作成した。

(3) 電極表面に固定された核酸プローブの定量

【0130】作成した核酸プローブ固定化電極を用いて 1/15Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) 中においてサイクリックボルタメトリを行なった。その結果、酸化処理時間が10秒の電極にはアデニンに由来する $1\mu\text{A}$ の酸化電流が、また酸化処理時間が60秒の電極には $2\mu\text{A}$ の酸化電流がそれぞれ測定された。また、電極表面上の核酸固定化量を Chemiprobe キットで測定したところ、そのそれぞれ $0.1\text{ pmol}/\text{cm}^2$ 、 $0.2\text{ pmol}/\text{cm}^2$ の核酸が固定化されていた。このことから、核酸に由来する酸化電流と固定化量との間に相関がみられ、核酸の電極反応から固定化された核酸プローブの定量が可能であることが示された。

参考例2：光ファイバ上の核酸プローブの定量

(1) アミノ基の核酸プローブへの導入

【0131】DNAラベリングキットである Chemiprobe を用いてラベルした発癌遺伝子v-myc (1.5 Kb) の3'末端に、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを用いて (6-アミノヘキシル) dATP を導入した。

(2) 光ファイバへの核酸プローブの固定化

【0132】光ファイバの表面を、10% γ -アミノプロピルトリエトキシシランのトルエン溶液中において 120°C で30分間還流することによりシラン化した。これをメタノールで洗浄した後、1%グルタルアルデヒド溶液中で30分間反応させ、再び洗浄した。次に、この光ファイバを、アミノ基を導入した v-myc $1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ の溶液中において室温で30分間反応することにより核酸プローブ固定化光ファイバを作成した。

(3) 光ファイバ表面に固定された核酸プローブの定量

【0133】作成した核酸プローブ固定化電極を用いて、 $1.0\mu\text{M}$ のアクリジンオレンジを含有する 1/15Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) 中において検出した結果、アクリジンオレンジに由来する蛍光を検出することができた。また、光ファイバ表面上の核酸固定化量を Chemiprobe キットで測定したところ、約 $0.1\text{ pmol}/\text{cm}^2$ の核酸が固定化されていた。これにより、挿入剤の蛍光強度の測定によって核酸固定化量を容易に決定できることが示された。

実施例7：核酸プローブ固定化電極と核酸サンプルとのハイブリダイゼーションの促進

【0134】検体試料にはpUC 119 のPst I Siteに v-myc断片を挿入したpVM 623 を使用した。pVM 623 をHind IIIで消化することでリニアにし、 98°C で熱変性させた。次に、核酸プローブ固定化BPPG電極を検体試料中に挿入し、 70°C で15分間インキュベートすることによってアニーリング反応を行なった。その際、電極に 0.1V (vs. SCE) の電位を印加した。

【0135】その後、二本鎖DNAに特異的で且つ電気化学的に活性な挿入剤であるアクリジンオレンジを添加

して電極反応を行ない、このとき流れる酸化還元電流を測定することによって検体試料中に含まれるv-myc を定量した。その結果、v-mycをpqオーダーで検出することができた。また、従来30分程度必要であったハイブリダイゼーションの時間が10分程度に短縮できた。

実施例8：核酸プローブ固定化電極の再利用

(1) Pt電極表面への核酸プローブの固定化

【0136】白金電極を高温処理し、電極表面を空気酸化した。次に、臭化シアン (CNBr) によって酸化被膜の表面を活性化した後、熱変性した一本鎖核酸プローブ (v-myc) 溶液に浸すことによって固定化を行なった。

(2) 核酸プローブ固定化電極を用いた遺伝子の検出

【0137】検体試料にはpUC 119 のPst I Siteに v-myc断片を挿入したpVM 623 を使用した。pVM 623 をHind IIIで消化することでリニアにし、 98°C で熱変性させた。次に、核酸プローブ固定化電極を検体試料中に挿入し、 70°C で15分間インキュベートすることによってアニーリング反応を行なった。その際、二本鎖DNAに特異的で且つ電気化学的に活性な挿入剤であるアクリジンオレンジを添加した。

【0138】アニーリング反応後に電極反応を行ない、このとき流れる酸化還元電流を測定することによって検体試料中に含まれるv-myc を定量した。その結果、v-mycをpqオーダーで検出することができた。

(3) 核酸プローブ固定化電極の再生

【0139】測定後の核酸プローブ固定化電極を 98°C で5分間加熱したところ、サンプルである pVM623 が核酸プローブ固定化電極表面から解離した。この再生電極は、その後少なくとも5回、繰り返して遺伝子の検出に利用できた。

実施例9：核酸プローブ固定化光ファイバの再生

(1) 光ファイバーへの核酸プローブの固定化

光ファイバーの先端部分をシラン剤 (γ -APTES) で処理した後、グルタルアルデヒドを架橋剤として一本鎖核酸プローブ (v-myc) を固定化した。

(2) 核酸プローブ固定化光ファイバーを用いた遺伝子検出

【0140】検体試料にはpUC 119 のPst I siteに v-myc断片を挿入したpVM 623 を使用した。pVM 623 をHind IIIで消化することでリニアにし、 98°C で熱変性させた。次に、核酸プローブ固定化光ファイバーを検体試料中に挿入し、 70°C で15分間インキュベートすることにより、アニーリング反応を行なった。その際、二本鎖のDNAに特異的であるアクリジンを添加した。

【0141】アニーリング反応の後、アクリジンの発する蛍光を測定することにより、検体試料中に含まれるv-myc を定量した。その結果、v-myc をpqオーダーで検出することができた。

(3) 核酸プローブ固定化光ファイバの再生

【0142】測定後の核酸プローブ固定化光ファイバを98℃で5分間加熱して熱変性させたところ、サンプルであるpVM623が核酸プローブ固定化電極表面から解離した。この再生光ファイバは、その後少なくとも5回、繰り返しして遺伝子の検出に利用できた。

実施例10：核酸プローブ固定化電極を具備する遺伝子検出装置を用いた遺伝子の検出

【0143】図1に示す自動遺伝子検出装置を用いて遺伝子の検出を行なった。検体試料にはpUC 119のPst I Siteにv-myc断片を挿入したpVM 623を使用した。pVM 623をHind IIIで消化することでリニアにし、98℃で熱変性させた。次に、核酸プローブ固定化電極を検体試料中に挿入し、70℃で15分間インキュベートすることによってアニーリング反応を行なった。その際、二本鎖DNAに特異的で且つ電気化学的に活性な挿入剤であるアクリジンオレンジを添加した。

【0144】アニーリング反応後に電極反応を行ない、このとき流れる酸化還元電流を測定することによって検体試料中に含まれるv-mycを定量した。その結果、v-mycをpqオーダーで検出することができた。また、全ての操作を1時間以内で自動的にこなすことができた。

実施例11：核酸プローブ固定化光ファイバを具備する遺伝子検出装置を用いた遺伝子の検出

【0145】図1に示す自動遺伝子検出装置において、遺伝子センサ5を光ファイバとし、電気信号検出制御装置6を蛍光検出器に変更して遺伝子の検出を行なった。検体試料にはpUC 119のPst I Siteにv-myc断片を挿入したpVM 623を使用した。pVM 623をHind IIIで消化することでリニアにし、98℃で熱変性させた。次に、核酸プローブ固定化光ファイバを検体試料中に挿入し、70℃で15分間インキュベートすることによってアニーリング反応を行なった。その際、二本鎖DNAに特異的で且つ電気化学的に活性な挿入剤であるアクリジンオレンジを添加した。

【0146】アニーリング反応後に電極反応を行ない、このとき流れる酸化還元電流を測定することによって検体試料中に含まれるv-mycを定量した。その結果、v-mycをpqオーダーで検出することができた。また、全ての操作を1時間以内で自動的にこなすことができた。

参考例3：電気化学発光を利用する、核酸プローブ固定化電極を具備する遺伝子検出装置を用いた遺伝子の検出

【0147】図4に示す自動遺伝子検出装置を用いて遺伝子の検出を行なった。検体試料には、ヒト末梢血から抽出したDNAに、pUC 119のPst I Siteにv-myc断片を挿入したpVM 623を混合したものを使用した。pVM 623はHind IIIで消化することでリニアにした。核酸プローブ固定化BPPG電極を底面に有する反応セルを作成し、この反応セルにサンプルを添加した後、98℃で5分間熱変性させた。次に、70℃で15分間インキュベートすることによってアニーリング反応を行なった。その際、二

本鎖DNAに特異的で且つ電気化学発光を生ずるルシゲニンを添加した。

【0148】アニーリング反応後に電気化学的な反応を行ない、生じた発光をフォトカウンタで検出した。その結果、v-mycをpqのオーダーで検出できることが示された。また、全ての操作を1時間以内で自動的にこなすことができた。

参考例4：核酸プローブ固定化ラテックスビーズを用いた遺伝子の検出

(1) アミノ基の核酸プローブへの導入

発癌遺伝子v-mycの3'末端に、ターミナルデオキシヌクレオチルトランスフェラーゼを用いて(6-アミノヘキシル)dATPを導入した。

(2) ラテックスビーズへの核酸プローブの固定化

【0149】粒径1μmのラテックスビーズに、ジシクロヘキシルカルボジイミドを架橋剤として一本鎖核酸プローブを固定化した。この核酸プローブ固定化ラテックスビーズをサンプル(v-mycを含む)溶液中で98℃に加熱して熱変性させた後、72℃で15分間ハイブリダイゼーションを行なった。この溶液中にアクリジンオレンジ溶液を添加して1分間放置した後、72℃の洗浄液(2×SSC、0.1% SDS)で洗浄し、リン酸緩衝液中で蛍光強度の測定を行なった。その結果、pqオーダーの遺伝子の検出が可能であった。

参考例5：核酸プローブ固定化ラテックスビーズを用いた遺伝子の検出

(1) アミノ基の核酸プローブへの導入

発癌遺伝子v-mycの3'末端に、ターミナルデオキシヌクレオチルトランスフェラーゼを用いて(6-アミノヘキシル)dATPを導入した。

(2) ラテックスビーズへの核酸プローブの固定化

【0150】粒径1μmのラテックスビーズに、ジシクロヘキシルカルボジイミドを架橋剤として一本鎖核酸プローブを固定化した。この核酸プローブ固定化ラテックスビーズをサンプル(v-mycを含む)溶液中で98℃に加熱して熱変性させた後、72℃で15分間ハイブリダイゼーションを行なった。この溶液中にアクリジンオレンジ溶液を添加して(終濃度1μM)1分間放置した後、溶液中の挿入剤の酸化還元電流を測定した。その結果、pqオーダーの遺伝子の検出が可能であった。

実施例12：直接もしくは間接的に信号を検出することが可能な物質を結合させた挿入剤を用いた遺伝子の検出

(1) 核酸プローブ固定化電極の作製

【0151】まず、発癌遺伝子v-mycに対する合成オリゴヌクレオチドプローブ(20mer)の3'末端に、ターミナルデオキシヌクレオチルトランスフェラーゼを用いて(6-アミノヘキシル)dATPを導入した。

【0152】これとは別に、ベールブレインバイロリティックグラファイト(BPPG)を10%硝酸および2.5%クロム酸カリウムを含有する溶液中において2.2

Vで電気分解することによりBPPG電極表面を酸化した。この電極を、さらに10%γ-アミノプロピルトリエトキシシランのアニリン溶液中において120°Cで30分間還流することによりシラン化した。次いで、メタノールで洗浄し、1%グルタルアルデヒド溶液中で30分間反応させた後洗浄した。

【0153】このBPPG電極を、アミノ基を導入した、v-mycに対する合成オリゴヌクレオチドブロープ1 μg/mlの溶液中において、室温で30分間反応させることにより核酸ブロープ固定化電極を作製した。

(2) 核酸ブロープ固定化電極を用いた遺伝子の検出

【0154】検体試料には、pUC 119のPst Iサイトにv-myc断片を挿入したpVM623を使用した。まず、このpVM623をHind IIIで消化してリニアにし、98°Cで熱変性させた。次いで、核酸ブロープを固定化したBPPG電極を検体試料中に挿入し、70°Cでインキュベートしてアニーリング反応を行なった。その後、フェロセンを結合したアクリジンオレンジを最終的に1 μMの濃度となるように添加した。電極を洗浄した後、直接電極反応を行ない、この際に流れる酸化還元電流を測定して検体試料中に含まれるv-mycを定量した。

【0155】検体試料中に目的とする遺伝子が存在しない場合にはフェロセンに由来する酸化還元電流は検出されなかったが、試料中にpVM623が含まれる場合には酸化還元電流を検出することができ、最終的にはv-mycをpgオーダーで検出することができた。また、B/F分離を行なう必要がないため、30分以内に検出を終了することができた。

実施例13：直接もしくは間接的に信号を検出することが可能な物質を結合させた挿入剤を用いた遺伝子の検出

【0156】まず、実施例12と同様の方法で核酸ブロープ固定化電極を作製した後、試料DNAの非特異的な吸着を抑制するために、ヌクレオチド(dATP、dCTP、dGTPおよびdTTP)の溶液に浸した。

【0157】検体試料にはpUC 119のPst Iサイトにv-myc断片を挿入したpVM 623を用いた。まず、このpVM 623をHind IIIで消化してリニアとし、98°Cで熱変性させた。次いで、核酸ブロープを固定化したBPPG電極を検体試料中に挿入し、70°Cでインキュベートしてアニーリング反応を行なった。この際、電極に0.1V (vs. SCE)の電位を印加した。

【0158】反応後、二本鎖核酸に特異的に結合し、かつ電極活性を有する挿入剤トリス(フェナントロリン)コバルト錯体を添加した。トリス(フェナントロリン)コバルト錯体が二本鎖核酸に結合した後、電極にマイナス電荷を印加して非特異的に結合している物質を除去した。その後、挿入剤の酸化還元電流を測定して検体試料中に含まれるv-mycを定量した。その結果、v-mycをpgオーダーで検出することができた。

実施例14：ルミノール結合核酸ブロープ固定化光ファイ

バーを用いた遺伝子の検出

(1) ルミノール結合核酸ブロープ固定化光ファイバーの作製

【0159】発癌遺伝子v-mycに対する合成オリゴヌクレオチドブロープ(20mer)の3'末端に、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを用いて(6-アミノヘキシル)dATPを導入した。この核酸ブロープをルミノールで標識した後、物理吸着により光ファイバー上に固定化した。

10 (2) 核酸ブロープ固定化光ファイバーを用いた遺伝子の検出

【0160】検体試料にはpUC 119のPst Iサイトにv-myc断片を挿入したpVM 623を使用した。このpVM 623をHind IIIで消化してリニアにし、98°Cで熱変性させた。次いで、ルミノール結合核酸ブロープ固定化光ファイバーを検体試料中に挿入し、55°Cでインキュベートしてアニーリング反応を行なった。この際、二本鎖核酸に特異的に結合するエチジウムブロマイドを添加した。これにより、エチジウムブロマイドが光ファイバー表面に濃縮される。その後、ルミノールをルシフェリンおよびH₂O₂で発光させ、それによりエチジウムブロマイドを励起させた。励起したエチジウムブロマイドから発生する蛍光を測定することにより、検体試料中に含まれるv-mycを定量した。その結果、v-mycをpgオーダーで検出することができた。

実施例15：O-フェニレンジアミン結合核酸ブロープ固定化光ファイバーを用いた遺伝子の検出

(1) O-フェニレンジアミン結合核酸ブロープ固定化光ファイバーの作製

30 【0161】発癌遺伝子v-mycに対する合成オリゴヌクレオチドブロープ(20mer)の3'末端に、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを用いて(6-アミノヘキシル)dATPを導入した。この核酸ブロープをO-フェニレンジアミンで標識した後、物理吸着により光ファイバー上に固定化した。

(2) 核酸ブロープ固定化光ファイバーを用いた遺伝子の検出

40 【0162】検体試料にはpUC 119のPst Iサイトにv-myc断片を挿入したpVM 623を使用した。このpVM 623をHind IIIで消化してリニアにし、98°Cで熱変性させた。次いで、O-フェニレンジアミン結合核酸ブロープ固定化光ファイバーを検体試料中に挿入し、55°Cでインキュベートしてアニーリング反応を行なった。反応後、アルカリホスファターゼ結合抗二本鎖DNA抗体を添加した。これにより、検体試料中に目的の遺伝子が存在する場合には抗体が光ファイバー表面に濃縮され、酵素反応が生じて405nmにおける吸収が生じる。この405nmにおける吸収を測定することにより検体試料中に含まれるv-mycを定量した。その結果、v-mycをpgオーダーで検出することができた。

参考例6: 核酸プローブに導入したアミノ基を介しての電極表面への固定化

(1) アミノ基を導入した核酸プローブの調製

【0163】 発癌遺伝子v-myc 約 1.0 Kb の断片の増幅に使用される2つのプライマー (20mer) を、DNA合成機 (アブライドバイオシステム社製、PCR-MATE EP) を用いて合成した。さらに、その一方のプライマーの5'末端に、アミノリンク2 (アブライドバイオシステム社製) を用いてアミノ基を導入した。

【0164】 この2つの合成プライマーを、それぞれ 100 μ g/ml の濃度で混合し、95°Cで5分間処理した後37°Cで30分間処理することによりアニーリングを行ない、核酸プローブを二本鎖とした。

(2) 核酸プローブの電極への固定化

【0165】 固定化用の電極としては、ベーサルブレインバイロリティックグラファイト (BPPG) を用いた。このBPPG電極を、10%硝酸および 2.5%クロム酸カリウムを含有する溶液中において 2.2Vで10秒間電気分解することにより電極表面を酸化した。表面酸化した電極を、10% γ -アミノプロピルトリエトキシシランのアニリン溶液中において 120°Cで30分間還流することによりシラン化した。シラン化した電極は、メタノールで洗浄した後、1%グルタルアルデヒド溶液中において30分間反応させ、さらに洗浄した。

【0166】 このBPPG電極を、(1) で調製した二本鎖の核酸プローブの 100 μ g/ml 溶液中において室温で30分間反応させて、電極表面に二本鎖核酸を固定化した。その後、再び95°Cで 5分間処理して熱変性させ、官能基が導入されていないDNA鎖を除去して核酸プローブ固定化電極を作成した。

実施例16: 脂質膜を介して核酸プローブを固定化した電極を用いた遺伝子の検出

(1) 核酸プローブ固定化電極の作製

【0167】 まず、ベーサルブレインバイロリティックグラファイト (BPPG) 電極表面上にホスファチジルエタノールアミンを用いて脂質膜を調製した。これとは別に、発癌遺伝子v-myc 1.5 Kbの3'末端に、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを用いて (6-アミノヘキシル) dATPを導入した。

【0168】 脂質膜で修飾したBPPG電極をグルタルアルデヒドで処理した後、アミノ基を導入したv-myc の 1 μ g/ml 溶液中において室温で30分間反応させることにより核酸プローブ固定化電極を作製した。

(2) 核酸プローブ固定化電極を用いた遺伝子の検出

検体試料には、pUC 119の Pst Iサイトに発癌遺伝子v-myc (1.5 Kb) を挿入したプラスミド pVM 623を用いた。

【0169】 この検体試料を95°Cで熱変性し、次いで上記(1) で作製した核酸プローブ固定化電極を挿入して55°Cでハイブリダイゼーション反応を行なった。ハイブリ

ダイゼーション反応を開始する前から核酸プローブ固定化電極における膜電位を連続して測定したところ、ハイブリダイゼーション反応の進行に従い膜電位に変化が見られ、反応開始から約 2時間後に定常状態となった。このように、膜を介して核酸プローブを固定化した電極を用いた場合には、ハイブリダイゼーション反応のモニタリングを行ないながら遺伝子の検出を行なうことが可能となる。測定の結果、目的とする遺伝子をpgオーダーで検出することが可能であった。

実施例17: 合成オリゴヌクレオチドでブロッキングした核酸プローブ固定化電極を用いた遺伝子の検出

(1) 核酸プローブ固定化電極の作製

【0170】 まず、発癌遺伝子v-myc に対する合成オリゴヌクレオチドプローブ (20mer) の3'末端に、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを用いて (6-アミノヘキシル) dATPを導入した。

【0171】 これとは別に、BPPG電極を10%硝酸および 2.5%クロム酸カリウムを含有する溶液中において 2.2Vで電気分解することにより表面を酸化した。次に、表面酸化した電極を、10% γ -アミノプロピルトリエトキシシランのアニリン溶液中において 120°Cで30分間還流することによりシラン化した。シラン化した電極は、メタノールで洗浄した後、1%グルタルアルデヒド溶液中において30分間反応させ、さらに洗浄した。次に、この電極を、アミノ基を導入したプローブの 1 μ g/ml 溶液中において室温で30分間反応させることにより核酸プローブ固定化電極を作製した。この核酸プローブ固定化電極を、合成ヌクレオチド (20mer) 溶液に浸し、電極表面に合成ヌクレオチドを吸着させた。

(2) 核酸プローブ固定化電極を用いた遺伝子の検出

【0172】 検体試料には pUC 119の Pst Iサイトに v-myc断片を挿入した pVM 623を使用した。まず、この pVM 623を、Hind IIIで消化してリニアにし、次いで98°Cで熱変性させた。次に、上記(1) で作製した核酸プローブ固定化BPPG電極を、熱変性した検体試料中に挿入し、70°Cでインキュベートすることによりアニーリング反応を行なった。その後、二本鎖核酸に特異的に結合し、かつ電極活性を有する挿入剤アクリジンオレンジを添加して電極反応を行ない、この際に流れる酸化還元電流を測定して検体試料に含まれるv-myc を定量した。その結果、v-myc をpgオーダーで検出することができた。また、電極表面をブロッキングしていない電極と比較してS/N比が向上していた。

実施例18: 目的遺伝子の増幅とその検出

(1) 目的遺伝子の増幅

【0173】 検体試料には pUC119 の Pst Iサイトに v-myc断片を挿入した pVM 623 (4.6 Kb) を用いた。この pVM 623を HindIIIで消化することによりリニアとし、その後、濃度を1 フェムトモル (10^{-15} モル) に調整した。この試料に対し、下記条件を1サイクルとするPC

Rを30回繰返し、v-mycの1Kb断片を増幅した。

変性 : 94°C、1分

プライマーのアニーリング : 55°C、1分

DNA鎖の伸長 : 72°C、1分

(2) 核酸プローブ固定化電極を用いた遺伝子の検出

【0174】PCRにより増幅した試料を98°Cで熱変性し、核酸プローブ固定化BPPG電極を検体試料中に挿入した後、70°Cで15分間インキュベートすることによりアニーリングを行なった。この際、検体試料中に、二本鎖核酸に特異的であり、かつ電極活性を有する挿入剤であるアクリジンオレンジを添加した。この後、電極反応を行ない、この際流れる酸化還元電流を測定することにより、検体試料中に含まれるv-mycを定量した。その結果、v-myc遺伝子の存在を確認することができた。

参考例7：目的遺伝子の増幅とその検出

(1) 目的遺伝子の増幅

【0175】検体試料にはpUC119のPst Iサイトにv-myc断片を挿入したpVM 623 (4.6 Kb)を用いた。このpVM 623をHindIIIで消化することによりリニアとし、その後、濃度を1フェムトモル(10^{-15} モル)に調整した。この試料に対し、下記条件を1サイクルとするPCRを30回繰返し、v-mycの1Kb断片を増幅した。

変性 : 94°C、1分

プライマーのアニーリング : 55°C、1分

DNA鎖の伸長 : 72°C、1分

なお、プライマーには、予めビオチンで標識したものをを用いた。

(2) 核酸プローブ固定化光ファイバーを用いた遺伝子の検出

【0176】PCRにより得られた試料を98°Cで熱変性し、核酸プローブ固定化光ファイバーを検体試料中に挿入した後、70°Cで15分間インキュベートすることによりアニーリングを行なった。次いで、アビジン結合西洋わさびペルオキシダーゼを反応させた後洗浄し、発光基質であるルミノール、 H_2O_2 、およびエンハンサーをさらに添加して、その発光を光ファイバーを介して検出した。その結果、v-myc遺伝子の存在を確認することができた。

実施例19：核酸プローブ固定化電極への核酸の非特異的吸着を抑制した遺伝子検出

【0177】検体試料にはpUC 119のPst Iサイトにv-myc断片を挿入したpVM 623を使用した。まず、この検体試料中のpVM 623をHindIIIで消化してリニアにし、98°Cで熱変性させた。次いで、核酸プローブ固定化BPPG電極を検体試料中に挿入し、70°Cでインキュベートすることによりアニーリングを行なった。アニーリングの後、電極に-1.5 V (vs. SCE)の電位を印加することにより電極表面に非特異的に物理吸着したDNAを脱着した。

【0178】次に、二本鎖核酸に特異的であり、かつ電

極活性を有する挿入剤アクリジンオレンジを添加し、電極反応を行なった。このとき流れる酸化還元電流を測定し、検体試料中に含まれるv-mycを定量した。その結果、v-mycをpgオーダーで検出することができ、検出の際のS/N比も従来の結果よりも向上していた。

実施例20：核酸プローブ固定化電極への核酸の非特異的吸着を抑制した遺伝子検出

【0179】検体試料にはpUC 119のPst Iサイトにv-myc断片を挿入したpVM 623を使用した。まず、この検体試料中のpVM 623をHindIIIで消化してリニアにし、98°Cで熱変性させた。次に、v-mycに対して50%のホモロジーを有する核酸プローブ (20 mer) を固定化したBPPG電極と、v-mycに対する核酸プローブを固定化したBPPG電極とを検体試料中に挿入し、70°Cでインキュベートすることによりアニーリングを行なった。

【0180】次に、二本鎖核酸に特異的であり、かつ電極活性を有する挿入剤アクリジンオレンジ添加し、電極反応を行なった。このとき流れる酸化還元電流を測定し、検体試料中に含まれるv-mycを定量した。

【0181】この電極反応の後、電極に-1.0 V (vs. SCE)の電位を印加し、ホモロジーの低い試料核酸を解離させた。次いで、上と同様にアクリジンオレンジを添加して電極反応を行ない、その際流れる酸化還元電流を測定した。その結果、挿入剤から検出される酸化還元電流値は、ホモロジーが50%であるプローブを用いた場合にはホモロジーが100%であるプローブを用いた場合の約50%程度であった。したがって、この方法により、変異した遺伝子の検出が可能であることが示された。

実施例21：核酸プローブ固定化電極を備えた、ディスプレイ反応セルを用いた遺伝子の検出

(1) 核酸プローブ固定化電極を備えた反応セルの作製

【0182】まず、発癌遺伝子v-myc (1.5 Kb)の3'末端に、ターミナルデオキシヌクレオチルトランスフェラーゼを用いて、予め(6-アミノヘキシル)dATPを導入した。

【0183】核酸プローブ固定化用の電極としては白金電極を用いた。まず、この白金電極を、180°Cで12時間加熱することにより電極表面を酸化した。次に、この電極を10%γ-アミノプロピルトリエトキシシランのアニン溶液中において120°Cで30分間還流することによりシラン化して洗浄し、1%グルタルアルデヒド溶液中でさらに30分間反応させて洗浄した。その後、この電極を、アミノ基を導入したv-mycの1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液中において室温で30分間反応させることにより核酸プローブ固定化電極を作製した。さらに、この核酸プローブ固定化電極を底面に備えた反応セル (5×5×10mm) を作製した。

(2) 核酸プローブ固定化電極を備えた反応セルを用いた遺伝子の検出

【0184】検体試料には、pUC 119のPst Iサイトに

10

20

30

40

50

v-myc断片を挿入した pVM 623 (4.6 Kb) を Hind III で消化した断片を使用した。この断片を含む溶液を (1) で作製した反応セルに入れ、95°Cで 5分間加熱して熱変性させた後、72°Cで30分間アニーリングを行なった。反応終了後、トリス (1,10- フェナントロリン) オスミウムを反応セルに添加し、電極に電位を印加することにより生じる電気化学発光を測定した。その結果、v-mycの検出がpgオーダーで可能であった。

実施例22: 核酸プローブ固定化電極を備えた、ディスプレイ反応セルを用いた遺伝子の検出

(1) 核酸プローブ固定化電極を備えた反応セルの作製

【0185】まず、発癌遺伝子 v-myc (1.5 Kb) の3'末端に、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを用いて、予め (6-アミノヘキシル) dATP を導入した。

【0186】核酸プローブ固定化用の電極としてはベールブレインバイロリティックグラファイト (BPPG) 電極を用いた。まず、このBPPG電極を、10%硝酸および 2.5%クロム酸カリウム溶液中で 2.2Vで電気分解することにより電極表面を酸化した。次に、この電極を10%γ-アミノプロピルトリエトキシシランのアニリン溶液中において 120°Cで30分間還流することによりシラン化してメタノールで洗浄し、1%グルタルアルデヒド溶液中でさらに30分間反応させて洗浄した。その後、この電極を、アミノ基を導入した v-mycの1 μg/ml 溶液中において室温で30分間反応させることにより核酸プローブ固定化電極を作製した。さらに、この核酸プローブ固定化電極を底面に備えた反応セル (5×5×10mm) を作製した。

(2) 核酸プローブ固定化電極を備えた反応セルを用いた遺伝子の検出

【0187】検体試料には、pUC 119 の Pst Iサイトに v-myc断片を挿入した pVM 623 (4.6 Kb) を Hind III で消化した断片を使用した。この断片を含む溶液を (1) で作製した反応セルに入れ、95°Cで 5分間加熱して熱変性させた後、72°Cで30分間アニーリングを行なった。反応終了後、トリス (1,10- フェナントロリン) コバルトを反応セルに添加し、サイクリックボルタンメトリーにより酸化還元電流を測定した。その結果、v-mycの検出がpgオーダーで可能であった。

参考例8: サンドイッチハイブリダイゼーションを利用した遺伝子の検出

(1) 第1の核酸プローブを固定化した電極の作成

【0188】まず、発癌遺伝子v-myc に対する合成オリゴヌクレオチドプローブ (20mer) を第1のプローブとし、その3'末端に、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを用いて (6-アミノヘキシル) dATP を導入した。

【0189】これとは別に、BPPG電極を10%硝酸および 2.5%クロム酸カリウムを含有する溶液中において

2.2Vで電気分解することにより表面を酸化した。次に、表面酸化した電極を、10%γ-アミノプロピルトリエトキシシランのアニリン溶液中において 120°Cで30分間還流することによりシラン化した。シラン化した電極をメタノールで洗浄した後、1%グルタルアルデヒド溶液中において30分間反応させ、さらに洗浄した。

【0190】次に、この電極を、アミノ基を導入した第1のプローブの 1μg/ml溶液中において室温で30分間反応させることにより、第1核酸プローブ固定化電極を作製した。

【0191】この第1核酸プローブ固定化電極を、ヌクレオチド (dATP、dCTP、dGTPおよびdTTP) 溶液に浸し、電極表面にヌクレオチドを吸着させてサンプルDNAの非特異的な吸着を抑制した。

(2) 第2の核酸プローブを用いた遺伝子検出

【0192】検体試料には pUC119 の Pst Iサイトに v-myc断片を挿入した pVM623 の HindIII断片を用い、また第2の核酸プローブとしては pUC119 の Pst I断片を用いた。第2プローブは、ビオロゲンで標識した。

【0193】検体試料および第2プローブを98°Cで熱変性した後、(1) で作製した第1プローブを固定化したBPPG電極を検体試料および第2プローブを含有する溶液中に挿入し、次いで70°Cでインキュベートすることによりアニーリングを行なった。この際、電極に 0.1V (vs.SCE) の電位を印加した。アニーリング終了後、電極にマイナス電位を印加して、電極に非特異的に吸着している物質を脱着した。その後、第2プローブに標識したビオロゲンの酸化還元電流を測定し、検体試料中に含まれる v-mycを定量した。その結果、v-mycをpgオーダーで検出することが可能であった。

実施例23: 核酸プローブ固定化電極を用いたRFPLP解析による間接遺伝子検出法

核酸プローブ固定化電極を用いて、DNAフィンガープリント法による個人識別を以下の通りに行なった。まず、ヒト末梢静脈血から密度勾配遠心を用いて白血球を分離し、定法に従いDNAを分離した。次いで、このDNAを制限酵素 Hae. IIIで消化した。

【0194】これとは別に、BPPG電極に Myoプローブを固定化して核酸プローブ固定化電極を作製し、さらにこの電極を高速液体クロマトグラフィ (HPLC) のカラム出口に配置した。このHPLCにサンプルを導入することにより、電極表面に固定化されたプローブとホモロジーがある配列を有するDNAが電極表面に一時的に保持されて二本鎖を形成し、さらにこの二本鎖に挿入剤等の二本鎖認識体が結合することにより二本鎖認識体由来する電気化学的な信号を測定をすることができ、得られた信号は特定のパターンを形成する。このパターンを解析することによりサンプルのパターニングを行なうことができる。

【0195】上述の断片化したDNAを95°Cで熱変性す

10

20

30

40

50

ることにより一本鎖にし、その後総乳剤であるアクリジンオレンジと一緒に上記HPLCにかけ、DNAのパターニングを行なった。この際、カラムは75°Cに保温した。

【0196】その結果、各々の被検者について、それぞれ異なったパターンが示された。すなわち、この発明の遺伝子検出法により、個人識別が可能であることが明確に示された。

参考例9：核酸プローブ固定化電極を用いた遺伝子の分離

【0197】モデル実験系として、大腸菌 JM 109 から抽出した染色体DNA溶液 (10ug/ml) 中に HindIIIでリニアにした 1ug/mlの pVM 623 (pUC 119 に v-mycを組み込んだもの) を混在させたものを使用し、v-myc 中の配列 (5' TGCAGTTCGGCTGCTGATC 3') をプローブとして検出および分離を行なった。

(1) 核酸プローブ固定化BPPG電極の作製

【0198】まず、BPPG電極を、2.5%クロム酸カリウム・10%硝酸溶液中において2.2Vで10秒間電気分解することにより、電極表面を酸化した。次に、この電極を10%γ-アミノプロピルトリエトキシシランのトルエン溶液中において120°Cで30分間還流することによりシラン処理を行なった。この処理により、電極表面にアミノ基が導入されたことになる。その後、さらに、1%グルタルアルデヒドを含む1/15Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) 中に室温で1時間放置することによりアルデヒド基を導入した。前述の合成プライマーを10mMリン酸緩衝液中で10ug/mlとなるように調製し、アルデヒド処理した電極を浸して室温で1時間放置した。これにより電極表面にプライマーが固定化された。

(2) 目的遺伝子の検出

【0199】大腸菌 JM 109 から抽出した染色体DNA溶液 (10ug/ml) 中に HindIIIでリニアにした 1ug/mlの pVM 623を混在させた試料溶液に、上記(1)で作製した核酸プローブ固定化BPPG電極を挿入し、55°Cでハイブリダイズさせた。その後、インターカレーターであるアクリジンオレンジを1μMとなるように添加し、電極応答を測定した。その結果、アクリジンオレンジに特有のピークが得られ、電極表面において二本鎖が形成されていることが示された。

(3) 目的遺伝子の分離

【0200】電極を試料溶液から引き上げ、バッファー中で95°Cに加熱することにより二本鎖を形成していた目的遺伝子を解離させた。次いで、v-myc 中の配列5' TGCAGTTCGGCTGCTGATC 3'および5' CGACTCGGAAGAACAAG 3'をプライマーとしてPCRを行なった。pVM 623 における、上記2種のプライマーと相補的な塩基配列の間の長さは約900bpである。PCRにより増幅された遺伝子を電気泳動にかけたところ、900bpのバンドが得られ、目的とするpVM 623が分離されたことが確認され

た。

【0201】対照として、pUC 118 を目的遺伝子およびpUC 118中の配列をPCRプライマーとして用いて同様の操作を行なったが、相当箇所にバンドは検出されなかった。

参考例10：核酸プローブ固定化フィルターを用いた遺伝子の検出

【0202】核酸プローブとしては発癌遺伝子 v-mycを選択した。この v-mycにグルタルアルデヒドを介してアミノアクリジンを結合し、さらに紫外線照射によりPVDFナイロンフィルターに固定化した。核酸プローブの固定化後、1mg/mlのATP溶液で処理することによりフィルター表面への非特異的な吸着を抑制した。

【0203】v-mycを含む試料溶液を98°Cに加熱して試料を熱変性させ、次いで、上記フィルターの表面に固定化された核酸プローブとのハイブリダイゼーションを72°Cで15分間行なった。反応終了後、72°Cの洗浄液 (2×SSC, 0.1%SDS) で洗浄し、フィルター表面における吸光度の変化を測定した。目的とする遺伝子が試料中に存在する場合には、吸光度の低下が観測された。測定の結果、数十pgオーダーの遺伝子の検出が可能であった。

【0204】また、同様の処理の後、フィルター表面における蛍光強度の変化を測定した。その結果、目的とする遺伝子が試料中に存在する場合には、蛍光強度の上昇が観測された。測定の結果、数十pgオーダーの遺伝子の検出が可能であった。

参考例11：二本鎖認識体固定化担体を用いた核酸の抽出
この例においては、担体として粒径10μmのマグネタイト粒子、二本鎖認識体としてアミノアクリジンを用いた。

【0205】まず、マグネタイト粒子をPBSでよく洗浄し、10% 3-アミノプロピルトリエトキシシランのトルエン溶液中において120°Cで2時間還流した後、メタノールで洗浄した。次に、1%グルタルアルデヒド溶液と反応させ、その後アミノアクリジンを固定化した。

【0206】サンプルにはヒト白血球を用いた。プラスチック容器内で白血球とアミノアクリジン固定化磁性粒子とを混合し、ボルテックスミキサーで激しく振動させることにより細胞の破碎と担体への核酸の結合を同時に行なった。その後、磁石を用いて外部から磁場をかけることによりマグネタイト粒子を分離し、200mMのNaClを含む10mMトリス緩衝液 (pH 7.0) で3回洗浄した。洗浄した粒子は、70%エタノールに添加し、核酸の溶出を行なった。

【0207】得られた核酸を1%アガロースゲルを用いて電気泳動した結果、20Kb以上の核酸断片が得られたことが明らかとなり、これらは制限酵素により切断可能であった。また、全ての操作が1時間以内に終了した。

実施例24：ステアリルアミンでブロッキングした核酸プ

41

ローブ固定化電極を用いた遺伝子の検出

(1) 核酸プローブ固定化電極の作製

【0208】まず、発癌遺伝子v-myc に対する合成オリゴヌクレオチドプローブ (20mer) の3'末端に、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを用いて (6-アミノヘキシル) d ATP を導入した。

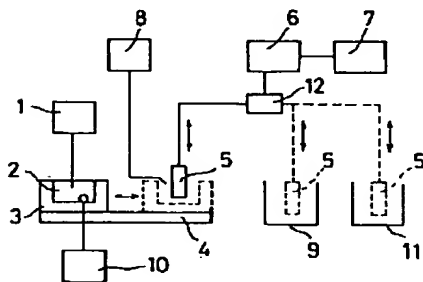
【0209】これとは別に、BPPG電極を10%硝酸および 2.5%クロム酸カリウムを含有する溶液中において 2.2Vで電気分解することにより表面を酸化した。次に、表面酸化した電極を、10%γ-アミノプロピルトリエトキシシランのアニリン溶液中において 120°Cで30分間還流することによりシラン化した。シラン化した電極は、メタノールで洗浄した後、1%グルタルアルデヒド溶液中において30分間反応させ、さらに洗浄した。次に、この電極を、アミノ基を導入したプローブの 1μg/ml溶液中において室温で30分間反応させることにより核酸プローブ固定化電極を作製した。

【0210】この核酸プローブ固定化電極は、電極表面への試料DNAの非特異的な吸着を抑制するために、ステアリルアミン溶液に浸して表面にステアリルアミンを吸着させた。

(2) 核酸プローブ固定化電極を用いた遺伝子の検出

【0211】検体試料には pUC 119の Pst Iサイトに v-myc断片を挿入した pVM 623を使用した。まず、この pVM 623を、Hind IIIで消化してリニアにし、次いで98°Cで熱変性させた。次に、上記(1)で作製した核酸プローブ固定化BPPG電極を、熱変性した検体試料中に挿入し、70°Cでインキュベートすることによりアニーリング反応を行なった。その後、二本鎖核酸に特異的に結合し、かつ電極活性を有する挿入剤アクリジンオレンジを添加して電極反応を行ない、この際に流れる酸化還元電流を測定して検体試料中に含まれるv-myc を定量した。*

【図1】



42

* その結果、v-myc を pgオーダーで検出することができた。また、電極表面をブロッキングしていない電極と比較してS/N比が向上していた。

【0212】

【発明の効果】以上詳述したように、本発明によれば核酸プローブを用いた遺伝子検出を簡便かつ短時間で行なうことができる。従って、本発明は遺伝子診断法や遺伝子工学の分野等、特定の遺伝子を検出する方法として極めて有用である。

【0213】また、本発明による自動遺伝子検出装置を用いることにより、上記方法による遺伝子検出を自動的に行なうことができる。したがって、より簡便かつ短時間に遺伝子の検出を行なうことができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明による自動遺伝子検出装置の一具体例を模式的に示す図。

【図2】図1に示す自動遺伝子検出装置における反応槽および遺伝子サンプル精製装置の他の態様を示す斜視図。

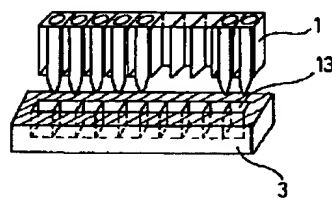
【図3】図1に示す自動遺伝子検出装置における温度コントローラの一具体例を示す斜視図。

【図4】電気化学発光を利用する自動遺伝子検出装置の具体例を模式的に示す図。

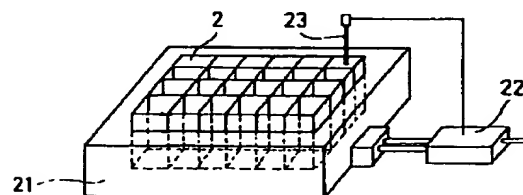
【符号の説明】

1、31…遺伝子サンプル精製装置、2…反応槽、3、34…温度コントローラ、5…遺伝子センサ、6…電気信号検出制御装置、7、39…計算機、9…検出槽、11…解離処理層、12、43…移動装置、32…反応セル、33…核酸プローブ固定化電極、36…参照電極、37…光ファイバ、38…ファンクションジェネレータ/ポテンショスタット、40…フォトマル、41…フォトンカウンタ、42…洗浄槽

【図2】



【図3】



【図4】

